

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ.–Prof. Dr. med. M. Herrmann

**KLINISCHE STAPHYLOKOKKENSTÄMME MIT
EINEM VERMINDERTEN ACETATKATABOLISMUS:
METABOLISCHE GRUNDLAGEN UND
AUSWIRKUNGEN AUF DIE PERSISTENZ**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von Daniela Stefanie Neumayer

geboren am 24 September 1985 in Saarlouis

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.1 Deutsche Fassung	1
1.2 Summary.....	2
2 EINLEITUNG	4
2.1 Die klinische Bedeutung von Staphylokokken.....	4
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	6
2.2 Persistenzmechanismen von Staphylokokken.....	8
2.2.1 Oxydativer Stress.....	8
2.2.2 Virulenzfaktoren von <i>S. epidermidis</i>	9
2.3 Metabolismus in Staphylokokken.....	11
2.4 Die Bedeutung des Tricarbonsäurezyklus.....	12
2.4.1 Wachstum und Überleben der Bakterien	14
2.4.2 Regulation und Produktion von Virulenzfaktoren	16
2.4.3 Small Colony Variants (SCV): Persistente Erreger mit einem defizienten TCA-Zyklus.....	18
2.4.4 Morphologische und metabolische Besonderheiten von VRSA und VISA	19
2.4.5 ClpC.....	21
1.1. Fragestellungen.....	23

3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Verwendete Bakterienstämme	24
3.1.2	Verwendete RT-PCR Primer	25
3.1.3	Chemikalien	26
3.1.4	Laborgeräte.....	28
3.2	Methoden	29
3.2.1	Screening.....	29
3.2.2	Bakterienkulturen	31
3.2.3	Bakterienwachstum.....	32
3.2.4	CFU-Determination	32
3.2.5	„Life-Death-Stain“	33
3.2.6	Gen-Expression	34
3.2.7	Bestimmen von Metaboliten im Bakterienüberstand	38
3.2.8	Aconitase Aktivitätsbestimmung.....	40
3.2.9	MHK-Bestimmung von Vancomycin.....	42
3.2.10	Statistische Auswertung	42
4	ERGEBNISSE.....	43
4.1	Vorversuch: Überprüfen der Verwendbarkeit des Phenolrotfarbstoffes	43
4.2	Screening.....	44
4.2.1	Übersicht über die verschiedenen Staphylokokkenarten an der Universitätsklinik des Saarlandes (UKS) (Versuchsaufbau siehe 3.2.1.1)	44
4.2.2	Unterschiede im Wachstum bei den häufigsten Staphylokokkenarten	46
4.2.3	Phenolrotscreening zur Identifikation von Stämmen mit einem eingeschränkten Acetatkatabolismus (Versuchsdurchführung siehe 3.2.1.2) ...	47
4.2.4	Unterschiede im Wachstum verschiedener Bakterienarten mit eingeschränktem Acetatkatabolismus versus normalem Katabolismus.....	48
4.2.5	Herkunft der Bakterien	50

4.3 Acetat Katabolismus.....	52
4.3.1 Acetat im Medium	52
4.3.2 Vergleich der Aconitase-Aktivität von IACSs und ACS	55
4.3.3 Korrelation zwischen dem Acetatgehalt und der Aconitase-Aktivität.....	57
4.4 Gen-Expression (Versuchsdurchführung siehe 3.2.6).....	58
4.5 Vitalitätsanalysen	63
4.5.1 Vergleich des Bakterienwachstums (Versuchsdurchführung siehe 3.2.3).....	63
4.5.2 CFU Determination und Anteil lebender/toter Zellen.....	64
4.5.3 Anteil lebender Zellen nach 30 Stunden Wachstum.....	67
4.5.4 Vergleichende Vitalitätsanalysen in der stationären Phase.....	68
4.6 Vancomycin Resistenz	72
5 DISKUSSION.....	73
5.1 Unterschiede zwischen den verschiedenen Staphylokokkenarten	73
5.2 Anwendbarkeit von Phenolrot als Indikator für das Screening auf einen verminderten Acetatkatabolismus.....	74
5.3 Wachstum und Metabolismus.....	76
5.4 Mögliche Grundlagen der verminderten Aconitase-Aktivität	78
5.5 Überlebensvorteile und Antibiotika Resistenz	80
5.6 Wachstumsbedingungen.....	82
5.7 Zusammenfassung.....	83
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	86
7 PUBLIKATIONEN.....	96

8	DANKSAGUNG	97
9	LEBENSLAUF	98

Abkürzungsverzeichnis

Acetate catabolizing *Staphylococcus*: **ACS**

Desoxyribonukleinsäure: **DNA**

Impaired acetate catabolizing *Staphylococcus*: **IACS**

Ribonukleinsäure: **RNA**

Tricarbonsäure-Zyklus: **TCA-Zyklus**

Antimikrobielle Peptide: **AMP**

Sequenztyp: **ST**

Koagulase negative Staphylokokken: **CoNS**

Polymerasekettenreaktion: **PCR**

Real-time Polymerasekettenreaktion: **rt-PCR**

Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*: **MRSA**

Methicillin resistenter *Staphylococcus epidermidis*: **MRSE**

Methicillin sensibler *Staphylococcus aureus*: **MSSA**

Community-acquired MRSA: **CA-MRSA**

Minimale Hemmkonzentration: **MHK**

Vancomycin resistenter *Staphylococcus aureus*: **VRSA**

Vancomycin intermediär resistenter *Staphylococcus aureus*: **VISA**

Caseinolytisches Peptid: **Clp**

Hitzeschockprotein: **Hsp**

nicht messbar: **n.m.**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Glukosestoffwechsels unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Staphylokokken [87]	12
Abbildung 2: Allgemeine Wachstumskurve von Bakterien (nach [29])	15
Abbildung 3: Darstellung des Farbspektrums von Phenolrot bei aufsteigenden pH Werten.....	30
Abbildung 4: Relative Verteilung der im Zeitraum Februar 2008 bis August 2008 gesammelten Staphylokokkenproben an der UKS.....	44
Abbildung 5: Absorptionen nach 15 Stunden Wachstum in TSB	46
Abbildung 6: Ergebnisse des Phenolrot-Screenings.....	48
Abbildung 7: Unterschiede in der Bakteriendichte nach 15 Stunden Wachstum	49
Abbildung 8: Acetatmenge im bakterienfreien Flüssigmedium. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	53
Abbildung 9: Acetatgehalt im Medium von <i>S. aureus</i> (inklusive MRSA).	54
Abbildung 10: <i>Staphylococcus epidermidis</i> Aconitase Aktivität	55
Abbildung 11: <i>Staphylococcus aureus</i> Aconitase-Aktivität (inkl. MSRA) zu verschiedenen Zeitpunkten.	56
Abbildung 12: Korrelation zwischen der Aconitase-Aktivität und der Acetatmenge bei <i>S. epidermidis</i>	57
Abbildung 13: Korrelation zwischen der Aconitase Aktivität und der Acetatmenge bei <i>S. aureus</i>	58
Abbildung 14: Relative Gen-Expression bei <i>S. epidermidis</i>	60

Abbildung 15: Relative Gen Expression in <i>S. aureus</i> ..	62
Abbildung 16: Wachstumskurve <i>S. epidermidis</i> .	63
Abbildung 17: Wachstumskurve <i>S. aureus</i>	64
Abbildung 18: CFU/ml in <i>S. epidermidis</i>	65
Abbildung 19: CFU/ml in <i>S. aureus</i> ..	66
Abbildung 20: Anteil lebender Zellen nach 30 Stunden Wachstum in <i>S. epidermidis</i> .	67
Abbildung 21: Life-Death Stain in <i>S. aureus</i>	69
Abbildung 22: Life-Death Stain in <i>S. aureus</i>	70
Abbildung 23: Anteil der lebenden Bakterien eines Stammes in der spätstationären Wachstumsphase	71
Abbildung 24: Vergleich der mittleren MIC-Werte für Vancomycin.....	72

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Fassung

Staphylokokken gehören sowohl zur normalen Standortflora der Haut, haben aber auch eine große Bedeutung als klinisch relevante Krankheitserreger. Vor allem *Staphylococcus aureus* ist ein sehr virulentes Pathogen. Aber auch die koagulase negativen Staphylokokken, wie *Staphylococcus epidermidis* gewinnen im Zeitalter zunehmender Antibiotikaresistenzen an Bedeutung. Verschiedene Faktoren bestimmen hierbei die Pathogenität eines Erregers. Hierzu gehört unter anderem die Fähigkeit eines Bakteriums, im Wirtsorganismus eine lange Zeit überleben und sich fortpflanzen zu können. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein veränderter Stoffwechsel in *Staphylococcus aureus* positive Auswirkungen auf die Persistenz haben kann. Diese Untersuchungen wurden bislang an Laborstämmen durchgeführt. Hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen einem verminderten Acetatmetabolismus und einer verminderten Sensibilität für Vancomycin. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob auch bei klinischen Stämmen ein verminderter Zitratzyklus vorliegt und ob dieser unter in vitro Bedingungen Auswirkungen auf die Persistenz hat. Hierzu erfolgte zunächst ein Screening der Staphylokokkenstämme am Universitätsklinikum des Saarlandes. Die gesammelten Stämme wurden unter streng aeroben Wachstumsbedingungen für 15 Stunden in TSB Medium inkubiert. Mittels des pH Indikator Phenolrot wurde anschließend zwischen einem Medium mit niedrigem pH (hinweisend für einen normalen Zitratzyklus) und einem basischen pH (hinweisend für einen eingeschränkten Zitratzyklus, da hier kein Acetat produziert und ins Medium ausgeschleust wurde) unterschieden. Bakterien, die im Screening durch einen niedrigen pH Wert des Mediums auffielen wurden nachfolgend als IACS (Impaired acetate catabolizing strain), solche mit einem hohen pH als ACS (Acetate catabolizing strain) bezeichnet. In den nächsten Schritten erfolgte bei ausgewählten Stämmen eine quantitative Bestimmung des Acetatgehaltes und der Aconitase Aktivität, wodurch sich die Screeningergebnisse bestätigen ließen.

Weiter konnte gezeigt werden, dass sowohl bei *S. aureus* als auch bei *S. epidermidis*, den in dieser Arbeit weitergehend untersuchten Spezies, in der IACS Gruppe ein erhöhter Anteil vitaler Zellen in der spätstationären Wachstumsphase vorlag. Dies könnte bedeuten, dass es auch in in-vivo Bedingungen einen Überlebensvorteil für Staphylokokken mit einem eingeschränkten TCA-Zyklus gibt. Da in der Literatur ein Zusammenhang zwischen *Staphylococcus aureus* Stämmen mit einer eingeschränkten TCA-Zyklus-Aktivität und einer verminderten Glykopeptid-Sensibilität beschrieben wurde, führten wir in den einzelnen Stämmen eine MHK Bestimmung durch. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen. Allerdings fand sich in den untersuchten Stämmen nur ein VISA und kein VRSA Stamm, was mit bislang niedrigen Prävalenz dieser Antibiotikaresistenz in unserem klinischen -Umfeld zu begründen ist. Interessant wäre hier vor allem klinische Stämme von *S. aureus* und CoNS mit einer bekannten eingeschränkten Vancomycinempfindlichkeit auf einen eingeschränkten Zitratzyklus hin zu untersuchen. Auch die Frage nach einem Überlebensvorteil des IACS Phänotyps in vivo gibt hier einen Anreiz für weitere Untersuchungen.

1.2 Summary

Staphylococci are part of the human microbiome, but are as well of importance as pertinent clinical pathogens. Especially *Staphylococcus aureus* is a highly virulent pathogen. But in times of emerging antibiotic resistences, also coagulase negative staphylococci, like *Staphylococcus epidermidis*, gain in importance. The pathogenicity is determinated by numerous parameters. Amongst others there is the ability of bacteria to survive in the host organism for a long term and to reproduce. Previous studies showed, that a modified metabolism in *Staphylococcus aureus* can have a positive influence on persistence. These studies were performed in laboratory strains so far, in which a positive correlation between an impaired acetate metabolism and an impaired susceptibility to

vancomycine could be shown. Within the present work we wanted to examine if there is also an impaired acetate catabolism in clinical strains and if this catabolism has an influence on persistence in vitro. So we performed a screening for staphylococcal strains at the Saarland university hospital. The collected strains were incubated under strict aerobic growth conditions in TSB. Afterwards, we distinguished via the pH indicator phenolred between a medium with a low pH (indicating a normal TCA Cycle) and a basic medium (indicating an impaired TCA Cycle, because less acetate has been produced here and transported into the medium) Bacteria which stood out by a low pH value will be named in the following as IACS (Impaired acetate catabolizing strain), while such with an high pH value will be called ACS (Acetate catabolizing strain). In the next steps we performed a quantitative determination of acetate in the broth and aconitase activity of selected strains, whereby we could confirm the screening findings. In addition it could be shown, that in *S. aureus* as well as in *S. epidermidis* (the further investigated species within this work) there is an increased amount of vital cells in the late stationary phase within the IACS group. This could imply that also in vivo there could be an enhanced survival. Previous works described a connection in *Staphylococcus aureus* strains with an impaired TCA cycle activity and an impaired glycopeptide susceptibility, so that we performed an MIC determination. No significant differences could be found. However in the analyzed strain just one VISA and no VRSA was determined, which is based on still low prevalence of the antibiotic resistance in our clinical environment. It would be interesting to investigate further clinical strains with a known impaired vancomycine susceptibility on an impaired TCA Cycle activity. Also the question about whether there is an enhanced survival in vivo gives an incentive for further research.

2 Einleitung

2.1 Die klinische Bedeutung von Staphylokokken

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus ist ein gram-positives Bakterium, das ein weites Spektrum von Krankheiten verursacht. Die Bandbreite reicht dabei von einfachen lokalen Weichteilinfektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Septikämien [6, 85]. Dennoch ist *S. aureus* kein obligat pathogenes Bakterium. Es lässt sich auch bei klinisch völlig unauffälligen Personen nachweisen und besiedelt bei diesen vorrangig die vorderen Nasenschleimhäute. Ca. 60% der Bevölkerung sind zumindest intermittierend Keimträger. Bei 20% lässt sich sogar immer *S. aureus* nachweisen. Bei ca. 20% der Menschen gelingt der Nachweis dagegen nie [100]. Die dauerhafte Besiedelung mit *S. aureus* stellt sogar einen Schutz vor dem Erwerb anderer Pathogene, insbesondere auch während einer Hospitalisierung, dar [59]. Dennoch handelt es sich bei *S. aureus* um ein bedeutendes Pathogen, das vor allem bei immuninkompetenten Personen schwere Krankheitsverläufe verursachen kann. Ein wichtiger Grund für die Pathogenität von *S. aureus* ist die Produktion verschiedener extrazellulärer Virulenzfaktoren, deren Expressionsmaximum unter *in vitro* Kultivierungsbedingungen vor allem während der postexponentiellen Wachstumsphase stattfindet [85].

2.1.1.1 Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*

Ein weiter wichtiger Grund für die Bedeutung von *S. aureus* als Pathogen ist seine Fähigkeit zur Resistenzbildung gegen viele gebräuchliche Antibiotika. Von besonderer Relevanz ist dabei der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Dieser wurde erstmals 1961 in England nachgewiesen, wurde bis 1981 endemisch in praktisch allen Krankenhäusern in den USA [3, 36]. und ist seither

weltweit, mit Beginn der 80er Jahre auch mit zunehmenden Raten in vielen europäischen Ländern inkl. Deutschland verbreitet. Insbesondere bei der Mortalität infolge einer Sepsis ließ sich in den folgenden 20 Jahren ein signifikanter Anstieg von MRSA im Gegensatz zu den Methicillin sensiblen *Staphylococcus aureus* Stämmen (MSSA) verfolgen [13]. Im Jahr 2005 konnten allein in den USA etwa 18650 Todesfälle auf MRSA zurückgeführt werden, womit dies eine häufigere Todesursache darstellte als Erkrankungen infolge einer Humanen Immundefizienz Virus (HIV)-Infektion, denen im gleichen Jahr etwa 17011 Todesfälle zugrunde lagen [72]. Seit Ende der 90er Jahre traten in den USA vermehrt MRSA Fälle auch ohne epidemiologischen Bezug auf Krankenhäuser oder das Gesundheitssystem auf. Diesem Phänomen zugrunde liegen neue MRSA Klone mit einem offensichtlich zur Übertragung zwischen Gesunden besonders prädisponierenden Genotyp. In Konsequenz lassen sich daher auch epidemiologisch zwei Formen unterscheiden: Der health care-associated MRSA (HA-MRSA), der also eine im Krankenhaus erworbene Infektion darstellt und der sogenannte community acquired MRSA (CA-MRSA), der nicht im Krankenhaus erworben wurde [16].

2.1.1.2 **Vancomycin-resistenter *Staphylococcus aureus* (VRSA) und Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA)**

Bei Infektionen mit MRSA stellen seit geraumer Zeit Glykopeptide und insbesondere Vancomycin die Therapie der Wahl dar [90]. Der vermehrte Einsatz dieses Antibiotikums zur Behandlung von durch MRSA verursachter Infektionen führte jedoch dazu, dass 1996 in Japan der erste Stamm mit einer intermediären Vancomycin-Resistenz (MHK 8 µg/ml) isoliert wurde [33]. Schon im folgenden Jahr fand sich solch ein Stamm auch in den USA. Bei diesen sogenannten „Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*“ (VISA) Stämmen liegt eine physiologische Adaptation an Vancomycin Konzentration von bis zu 4µg/ml vor. Davon abgegrenzt werden die sogenannten heterogenen Vancomycin-intermediate *S. aureus* (hVISA), bei denen insgesamt eine MHK von 1-2 µg/ml

vorliegt, wobei Subpopulationen von Tochterzellen auch bei 4 µg Vancomycin/ml noch wachsen können [1]. Sowohl bei den hVISA als auch bei den VISA Isolaten beruht die eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin auf einer dickeren Zellwand, einer erhöhten Aktivierung der Zellwandsynthese und einer reduzierten Autolyse [56]. Zudem wurden *S. aureus* Stämme beschrieben, die das sogenannte *vanA* Gencluster besitzen, welches für ein remodeliertes Peptidoglycan kodiert, woraus eine „high-Level-Resistenz“ für Vancomycin resultiert [56]. Dabei spricht man von VRSA Stämmen, wenn die MHK für Vancomycin mehr als 16 µg/ml beträgt. *VanA* kann dabei durch Transkonjugation aus Enterokokken übernommen werden, der Transport erfolgt dabei auf dem mobilen genetischen Element Tn 1546 [41]

2.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis ist in erster Linie als ein kommensaler Bewohner der gesunden Haut mit einem eher geringen pathogenen Potenzial anzusehen, der nur sehr selten zu Infektionen bei immunkompetenten Personen führt. Immer mehr jedoch gewinnt das Bakterium an Bedeutung als wichtiger Verursacher von nosokomialen, also im Rahmen eines stationären Krankenhausaufenthaltes aufgetretener Infektionen [46]. Dabei werden vor allem schwer kranke und lange hospitalisierte Patienten infiziert. Mittlerweile wird *S. epidermidis* zusammen mit *S. aureus* als Hauptverursacher von nosokomialen Infektionen angesehen [57]. Bei Infektionen, die aufgrund der Besiedelung von medizinischen Kathetern auftreten, stellt *S. epidermidis* sogar den häufigsten Erreger dar. Dies lässt sich unter anderem darauf zurückführen, dass das Bakterium, als ubiquitärer Hautbewohner, medizinisches Material schon beim Kontakt mit der Epidermis kontaminieren kann und zusammen mit diesem in den Körper eintritt [95]. Die Anzahl der Infektionen in Verbindung mit Zentralvenenkathetern (ZVK) hat in den letzten Jahren analog zu der häufigeren Implantation derselben zugenommen. So kam es bei 0,4-0,5% aller ZVK Implantationen auf Intensivstationen der USA zu Septikämien, die zu 22% von *S. epidermidis* ausgelöst wurden [63]. Dabei kommt es allerdings nur sehr

selten zu lebensbedrohlichen Infektionen. Treten diese jedoch auf, so sind sie aufgrund von spezifischen Resistenzen und der starken Tendenz zur Biofilmbildung dieses Erregers nur sehr schwer zu behandeln [73, 76]. Diese Biofilmbildung in Zusammenhang mit der Resistenzlage erklärt, dass die Infektionen meist einen subakuten und chronischen Charakter besitzen [50]. Als am häufigsten isolierter Keim menschlicher Epithelien besiedelt *S. epidermidis* vor allem die Axilla, den Kopf und die Nasenlöcher [40]. Er gehört zu den Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS), die von den Koagulase-positiven Staphylokokken abzugrenzen sind [64]. Die Bakterienart *S. epidermidis* besitzt einen hohen Diversitätsgrad mit bislang 74 identifizierten Sequenztypen (STs) [53]. Die meisten klinischen Isolate, wie auch der am häufigsten isolierte Sequenztyp 2 (ST2), dessen Isolate meistens eine *in vitro* Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzen, gehören dabei zum sogenannten „Klonalen Komplex 2“ (CC2) [45]. Einen Grund für die Pathogenität von ST2 *S. epidermidis* findet man in der Tatsache, dass bislang alle Isolate Faktoren besitzen, die eine Invasivität begünstigen [21, 103]. Zudem beobachtet man in *S. epidermidis* eine insgesamt heterogene Genexpression, was wahrscheinlich zu einer besseren Adaptation an wechselnde Umweltgegebenheiten beiträgt [105].

2.1.2.1 Die Wirtsabwehr in Bezug auf *Staphylococcus epidermidis*

Auf der menschlichen Haut selbst, die den Hauptlebensraum von *S. epidermidis* darstellt, stehen dem Bakterium nur wenige Faktoren der Wirtsabwehr gegenüber. Einer davon ist die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP) [31]. Nach dem Eindringen in den Körper finden sich jedoch eine Vielzahl von Abwehrmechanismen. Die erste „Verteidigungslinie“ bildet dabei das angeborene, nicht spezifische Immunsystem, welches einen humoralen und einen zellulären Anteil besitzt [64]. Von Bedeutung sind hierbei vor allem die neutrophilen Granulozyten. Sie sind die anteilmäßig häufigsten Leukozyten. Eindringende Mikroorganismen werden anhand von Oberflächenstrukturen erkannt und in die Zelle aufgenommen, wo sie anschließend durch reaktive Sauerstoffspezies

zerstört werden [19]. Die nächste wichtige Säule in der Wirtsabwehr ist das erworbene spezifische Immunsystem, welches auf einer antigenabhängigen Expansion von B- und T-Zellen infolge der Stimulation durch Antigen-präsentierende Zellen beruht und verzögert abläuft. Das spezifische Immunsystem setzt sich somit aus einem zellulären Anteil und einem humoralen Anteil zusammen, der Antikörper-vermittelt ist [64]. Die Rolle des erworbenen Immunsystems in Bezug auf *S. epidermidis* ist bislang nur wenig verstanden. Es scheint nicht immer effizient gegen *S. epidermidis* Infektionen zu sein, da Langzeitinfektionen, trotz einer ausreichenden Bildung von Antikörpern gegen *S. epidermidis*, nicht hinreichend bekämpft werden können [68].

2.2 Persistenzmechanismen von Staphylokokken

2.2.1 Oxydativer Stress

Ein Nebenprodukt des oxidativen Stoffwechsels stellen die sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dar. Zu diesen gehören das Superoxid-Anionenradikal (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradical ($HO\cdot$). Sie sind dabei in die Initiation und die Ausbreitung der freien Radikalen Kettenreaktion involviert [75]. Wasserstoffperoxid kann dabei z.B. mit intrazellulärem Fe^{2+} über eine Fenton-Reaktion zu hoch toxischen Sauerstoffradikalen reagieren [101]. Wasserstoffperoxid kann dabei z.B. mit intrazellulärem Fe^{2+} über eine Fenton-Reaktion zu hoch toxischen Sauerstoffradikalen reagieren. Diese sind in der Lage, Lipide, Proteine und Nukleinsäuren zu schädigen, was sowohl in eukariotischen als auch in prokariotischen Zellen letztlich zu einem Alterungsprozess oder gar dem Zelltod führt [88]. Auch die Exposition gegenüber bakteriziden Antibiotika, die in unterschiedlichster Weise in den bakteriellen Stoffwechsel eingreifen können, führt zu einer erhöhten Produktion von ROS. Durch diese Mechanismen haben Antibiotika auf indirektem Weg auch einen hemmenden Einfluss auf die TCA Zyklus Aktivität. Hierdurch kommt es zu einer Verminderung von NADH, was mit

einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht [101].

2.2.2 Virulenzfaktoren von *S. epidermidis*

S. epidermidis besitzt im Gegensatz zu *S. aureus* prinzipiell zwar nur ein geringes Virulenzpotenzial und verfügt kaum über lösliche und hoch aggressive Virulenzfaktoren. Es ist dafür aber sehr gut mit Faktoren ausgestattet, die dem Entgehen der Immunabwehr des Wirtsorganismus dienen [64]. Hier ist insbesondere die Protease SepA zu nennen, welche antimikrobielle Peptide (AMPs) durch Proteolyse eliminiert [44].

2.2.2.1 Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis* – Schutz vor der Wirtsabwehr

Eine der Hauptursachen für die Pathogenität von *S. epidermidis* ist seine Fähigkeit zur Bildung von dicken Biofilmen. Die extrazelluläre Matrix des Biofilms schützt das Bakterium physikalisch zum einen vor der Phagozytose durch Zellen der Immunabwehr und zum anderen vor antimikrobiellen Peptiden [98]. Die Fähigkeit zu Biofilmbildung ist bei Staphylokokken aus dem nosokomialen Bereich stärker ausgeprägt, als bei solchen, die ambulant erworbene Infektionen verursacht haben [27]. So finden Infektionen mit *S. epidermidis* vor allem bei hospitalisierten Patienten statt. Sie stehen meist im Zusammenhang mit medizinischen Hilfsmitteln, wie zum Beispiel intravenösen Kathetern, Herzschrittmachern oder Blasenkatetern und einer Vielzahl weiterer Implantate aus Metall oder Kunststoffen [104]. Unter einem Biofilm versteht man ein dichtes Konglomerat von Bakterien, das durch Produktion einer extrazellulären Matrix, die die Staphylokokken zudem vor Antibiotikaeinflüssen und dem Immunsystem schützt, aneinander und auf einer Oberfläche haften [14]. Protein- und Zellwandsynthese werden dabei herabreguliert [102]. Die Bildung eines Biofilms gliedert sich dabei in drei Hauptschritte auf: Zunächst erfolgt die Adhäsion des Bakteriums an die zu

besiedelnde Oberfläche, das „primary attachment“, welches durch physikalische und chemische Oberflächeneigenschaften vermittelt wird. Nun vermehren sich die Bakterien. Anschließend erfolgt die Akkumulation mehrerer Zellen zu einer mehrschichtigen Zellstruktur (accumulative phase) [27, 47, 48]. Im weiteren Verlauf haben die meisten Bakterien nun keinen Kontakt zu der eigentlichen Oberfläche mehr. Ihr Verbleiben im Biofilm wird über den Zell-Zell-Kontakt gesteuert. Einen wichtigen Mediator hierfür stellt dabei das "polysaccharide intercellular adhesin" (PIA) dar [49, 78]. Hierbei handelt es sich um ein positiv geladenes Homoglykan aus β -1,6 N-Acetylglucosamin (NAG) [49], das die Hämagglutination und die Bakterienaggregation steuert. In Zusammenspiel mit der poly- γ -Glutaminsäure (PGA) wird so die Phagozytose und das Abtöten der Bakterien durch neutrophile Granulozyten verhindert. Der PIA-Syntheseapparat wird durch den *icaADBC* Genlocus codiert [32], welcher vor allem in klinischen Isolaten weit verbreitet ist [21] und in bis zu 85 % der aus Blutkulturen isolierten *S. epidermidis*-Isolate zu finden ist [106]. Besondere Bedeutung hat PIA dabei bei der Reifung des Biofilms [32, 104]. Einen weiteren wichtigen Faktor bei der Biofilmbildung bildet die interzelluläre Kommunikation über „quorum-sensing“ Systeme. Der „accessory gene regulator“ Lokus (*agr*), welcher hierfür die größte Bedeutung in Staphylokokken besitzt, scheint allerdings keinen Einfluss auf die *ica* Expression und die Produktion von PIA zu haben [62].

2.2.2.2 Multiresistenzen

Ein zweiter Hauptgrund für die Bedeutung von *S. epidermidis* als nosokomialer Erreger sind seine Resistenzen gegen verschiedene gebräuchliche Antibiotika, insbesondere Methicillin. Letztere wird, analog zu *S. aureus*, über das *mecA* Gen vermittelt, welches für ein Penicillin-bindendes Protein mit einer reduzierten Affinität für β -Laktam Antibiotika kodiert, das eine Resistenz nicht nur gegen Methicillin, sondern gegen alle β -Laktam Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und β -Laktamase-Inhibitoren vermittelt. Eine Multiresistenz ist zudem so gut wie immer mit einer Methicillin-Resistenz

vergesellschaftet [105]. Insgesamt findet man in 75-90 % aller klinischen CoNS Isolate, vor allem in *S. epidermidis*, eine Methicillin Resistenz [65, 87]. Diese erhebliche Prävalenz von multiresistenten Stämmen ist - wohl durch verschiedene nicht geklärte Selektionsvorgänge ebenfalls begünstigt - besonders im klinischen Bereich ausgeprägt. Annähernd 80% aller aus Katheter-assoziierten Infektionen entnommenen Proben sind multiresistent. Dem gegenüber zeigen bei gesunden Individuen isolierte *S. epidermidis* Stämme meistens eine gute Empfindlichkeit gegenüber den meisten Antibiotika [42]. Das *mecA* Gen inklusive seiner Regulatoren liegt auf der sogenannten „staphylococcal cassette chromosome *mec*“ (SCC*mec*), welche zudem Rekombinasen und verschiedene mobile DANN-Elemente, wie Transposons, Insertionssequenzen oder integrierte Plasmide enthalten kann [34]. SCC*mecs* werden als mobile Elemente betrachtet, die dem „gene shuffling“ und der Rekombination dienen. Dabei ist nicht nur ein horizontaler Transfer der Methicillin-Resistenz, sondern auch anderer Gene zwischen den verschiedenen Staphylokokkenarten möglich [23]. Somit können *S. epidermidis* und auch andere Koagulase-negative Staphylokokken (CoNS) als Genreservoir für *S. aureus* dienen [105].

2.3 Metabolismus in Staphylokokken

S. aureus und *S. epidermidis* verfügen prinzipiell über die Fähigkeit, Stoffwechselwege, wie etwa die Glykolyse, den Pentosephosphatweg und den Tricarbonsäurezyklus zur Energiegewinnung ablaufen zu lassen. Wenn unter aeroben Bedingungen genügend schnell verstoffwechselbare Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glukose, für das Bakterium verfügbar sind, so kommt es zum exponentiellen Wachstum, wobei die hierfür benötigte Energie vorrangig über die Glykolyse bereitgestellt wird. Dabei werden pro Molekül Glukose jeweils zwei Moleküle Pyruvat produziert und zwei Moleküle NAD⁺ zu NADH reduziert. Die vorherrschenden Wachstumsbedingungen sind verantwortlich für den weiteren Verlauf des Pyruvat-Katabolismus.

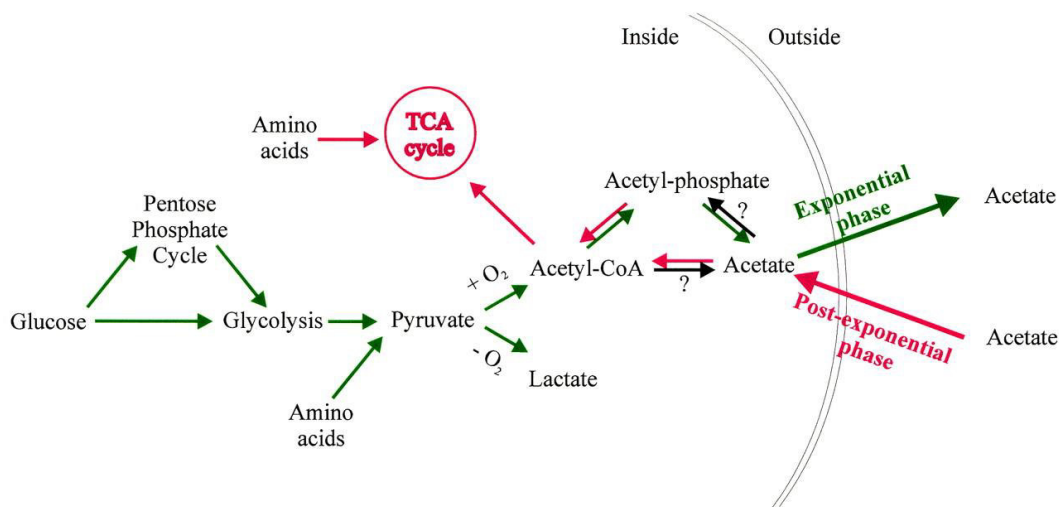


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Glukosestoffwechsels unter aeroben und anaeroben Bedingungen in Staphylokokken [87]

Unter anaeroben Bedingungen wird es vor allem zu Laktat reduziert, wodurch wiederum NADH reoxidiert wird, welches so wieder in der Glykolyse zur Verfügung stehen kann [43]. Wenn ausreichend Sauerstoff vorhanden ist, wird das Pyruvat enzymatisch über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA und CO_2 verstoffwechselt [22]. Das weitere Schicksal des Acetyl-CoA ist nun abhängig von der Zusammensetzung des umgebenden Mediums. Wenn sich noch genügend schnell verstoffwechselbare Kohlenstoffe finden, wird es zur Herstellung von Acetyl-Phosphat, einem Phosphatspender verwendet, welcher in der Substrat-Level Phosphorylierung verwendet wird, um Essigsäure und ATP herzustellen. Diese Phase entspricht der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien in vitro. Die exponentielle Wachstumsphase endet schließlich, wenn die Menge der schnell verstoffwechselbaren Kohlenstoffe zu gering für ein schnelles Wachstum ist. Schließlich geht das Ende der exponentiellen Wachstumsphase mit dem Beginn der Acetatverstoffwechselung einher [87].

2.4 Die Bedeutung des Tricarbonsäurezyklus

Für eine große Anzahl von Organismen ist der Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus, auch

Krebs- oder Zitratzyklus genannt, ein grundlegender Stoffwechselweg zur Energiegewinnung und Produktion bedeutender Zwischenprodukte der Biosynthese. Pathogene Organismen lassen sich bezüglich des TCA-Zyklus in drei Gruppen einteilen: Zum einen gibt es Bakterien, wie zum Beispiel *Streptococcus pyogenes*, die keinen TCA-Zyklus besitzen und daher abhängig von ihrem jeweiligen Wirt sind, um Aminosäuren oder andere wichtige Stoffwechselzwischenprodukte zu erhalten. Andere Pathogene hingegen besitzen einen nur unvollständigen TCA-Zyklus, der sie auxotroph für verschiedene Aminosäuren macht. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem *Yersinia pestis* und *Haemophilus influenzae*. Die dritte Gruppe setzt sich aus Organismen mit einem kompletten TCA-Zyklus zusammen. Allerdings können auch die Bakterien in dieser Gruppe, abhängig von anderen limitierenden Faktoren, auxotroph für bestimmte Aminosäuren sein [87]. Die transkriptionelle Regulation der Gene für den TCA-Zyklus ist dabei vor allem von der Verfügbarkeit von Sauerstoff und Kohlenstoffquellen abhängig [28, 89]. In gram-positiven Bakterien kommt es unter Anwesenheit von schnell verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen, wie zum Beispiel Glukose und Glutamat, zu einer Unterdrückung der für den Zitratzyklus wichtigen Gene und somit des kompletten Zyklus. Der Metabolismus läuft hier vorrangig über die Glykolyse und den Pentosephosphatweg ab [12]. Das über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex produzierte Acetyl-CoA wird in der exponentiellen Wachstumsphase vorrangig zu Acetylphosphat umgewandelt, mit welchem im Rahmen der Substrat-Level Phosphorylierung ATP hergestellt werden kann. Dabei entsteht auch Acetat, welches aus der Zelle hinaus transportiert wird [85, 86]. Wenn nun z.B. unter *in-vitro* Bedingungen alle schnell verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen soweit aufgebraucht sind, dass ein schnelles Wachstum nicht mehr gewährleistet ist, oder kommt es zu einer Akkumulation von Molekülen wie Laktat oder Acetat, die in höheren Konzentrationen wachstumshemmend wirken, so führt dies im Rahmen der postexpositionellen Wachstumsphase zur Aufhebung der Repression des TCA-Zyklus und konsekutiv zu einem Rücktransport des Acetats in das Bakterium hinein. Dabei wird das reimportierte Acetat in einem ersten Schritt mittels der Acetyl-CoA-Synthetase (AcsA) in Acetyl-CoA umgewandelt. Dieses kann nun in

den TCA-Zyklus einfließen und zusammen mit Oxalacetat mit Hilfe des Enzyms Zitratsynthase zu Zitrat umgewandelt werden. Anschließend wird das Zitrat durch das Schlüsselenzym des Zitratzyklus, der Aconitase, zu Isocitrat umgewandelt. Die postexponentielle Wachstumsphase ist also abhängig von einem funktionierenden TCA Zyklus und geht mit dem Katabolismus von nicht-präferierten Kohlenstoffquellen wie z.B. Acetat einher [85, 87]. In dieser Wachstumsphase produziert *S. aureus* auch die meisten extrazellulären Virulenzfaktoren. Zur Synthese vieler Aminosäuren werden oxidierte dinukleotide Cofaktoren wie NAD⁺, FAD⁺ und NADP⁺ benötigt. Durch den TCA-Zyklus werden reduzierte Dinukleotide produziert, in der postexponentiellen Phase kommt es schließlich zu einer erhöhten oxidativen Phosphorylierung, die so entstandenen oxidierten Dinukleotide stehen nun der Aminosäuresynthese zur Verfügung [86].

2.4.1 Wachstum und Überleben der Bakterien

Unter *in vitro* Bedingungen zeigen die meisten Bakterien, so auch Staphylokokken, in einem reichhaltigen Nährmedium ein spezifisches Wachstumsmuster. Dabei lassen sich vier verschiedene Wachstumsstadien unterscheiden, deren jeweilige Dauer sowohl von Außenfaktoren (z.B. der Nährstoffzusammensetzung im Kulturmedium, der Temperatur oder der Oxidation) als auch von der Bakterienart abhängt.

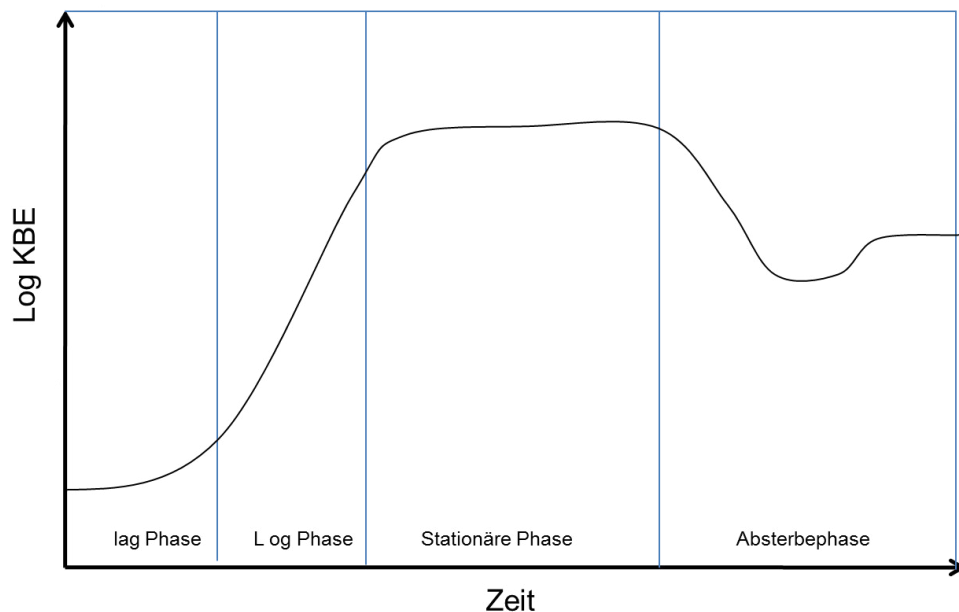


Abbildung 2: Allgemeine Wachstumskurve von Bakterien (nach [29])

Direkt nach Einbringen der Bakterien in das Wachstumsmedium kommt es zunächst zu keiner nennenswerten Wachstumsrate, die Zellanzahl bleibt weitestgehend konstant, obwohl günstige Wachstumsbedingungen vorliegen. Im Rahmen dieser sogenannten Latenzphase (*lag*-Phase) müssen die von den Bakterien benötigten Enzyme, die zum Abbau der im jeweiligen Milieu befindlichen Nährstoffe im Sinne einer „Enzyminduktion“ erst synthetisiert werden. Anschließend kommt es zur exponentiellen Wachstumsphase (*log*-Phase), in welcher die Vermehrungsgeschwindigkeit ihr Maximum erreicht und somit durch eine sehr schnelle Zunahme der Bakteriendichte gekennzeichnet ist [29]. Diese Phase dauert im TSB Medium bei einem Startinokulum mit einer OD_{600} von 0,01 ungefähr bis zu einer Inkubationszeit von 8 Stunden. Anschließend kommt es zum Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, hier zeigt sich zunächst eine leichte Abnahme der Bakteriendichte und anschließend, für etwa 72 Stunden, eine konstante Bakteriendichte [7]. In Staphylokokken hat die Inaktivierung des TCA-Zyklus dabei verschiedene Auswirkungen. So kommt es in Bakterien mit einem „knock out“ der Aconitase zu einem verfrühten Eintritt in die stationäre Phase. Die Verdoppelungszeit und die Länge der exponentiellen Wachstumsphase

entsprechen allerdings denen eines isogenen Wildtyps, was der physiologischen Repression des TCA-Zyklus während dieser Wachstumsphase zugrunde zu legen ist. Interessanterweise führt dieser verfrühte Eintritt nicht zu einem vorzeitigen Absterben der Bakterien mit einer Aconitase-Inaktivierung. Für eine vollständige Zelllyse scheint sogar ein voll funktionsfähiger TCA-Zyklus notwendig zu sein, denn anders als Wildtyp-Stämme zeigen Aconitase-Mutanten eine signifikant verlangsamte Abnahme an lebensfähigen Zellen in der spätstationären Phase [85]. Auch in der Bakteriengröße selbst zeigen sich Unterschiede zwischen Bakterien mit und ohne TCA-Zyklus. Normalerweise kommt es beim Übertritt in die stationäre Wachstumsphase zu einer signifikanten Verkürzung des Bakteriendurchmessers. In TCA-Zyklus-defizienten Mutanten ist diese Verkürzung dagegen nicht zu beobachten [85].

2.4.2 Regulation und Produktion von Virulenzfaktoren

Die Produktion von Virulenzfaktoren steht ebenfalls in Verbindung mit dem TCA-Zyklus. Auch PIA, der wichtigste Virulenzfaktor in *S. epidermidis* [4, 42, 77], unterliegt der Regulierung von nutritiven und Umweltsignalen [15, 17, 27, 70]. In vitro zeigt sich bei der Produktion von Virulenzfaktoren ein Zusammenhang mit dem Wachstumszyklus der Bakterien. So werden in der exponentiellen Phase vor allem Oberflächenproteine wie z.B. Adhäsionsproteine synthetisiert. Die Expression der meisten Virulenzfaktoren, insbesondere der Exoproteine von Staphylokokken, erreicht während der postexponentiellen Wachstumsphase ihr Maximum [9]. Die Transkription und Synthese der Virulenzfaktoren ist zudem von der Umwelt und dem Nährstoffangebot abhängig [85]. Ein wichtiger Regulator der Toxinsynthese ist der „accessory gene regulator“ (agr) Locus [86]. Es handelt sich hierbei um ein Quorum-sensing System, das sowohl in *S. aureus* als auch in *S. epidermidis* die Biosynthese verschiedener Exoproteine kontrolliert. Die Genexpression wird dabei durch die Akkumulation eines autokrinen Pheromon-Peptids gesteuert [66]. Der *agr*-Locus besteht aus 2 divergierend transkribierten Einheiten, die von den Promotern P2 und P3 kontrolliert werden [60], welche die

Transkription von RNA II und RNA III steuern [9, 85] Hierbei handelt es sich auch um Riboregulatoren [85]. RNA II fungiert als Operon für die vier Gene *agrBDCA*, die benötigt werden um das „autoinducing peptide“ (AIP) zu synthetisieren und die Regulatorkaskade zu aktivieren [60]. Dabei ist AgrD das Vorläufer-Peptid von AIP. Bei AgrB handelt es sich um eine Membranendopeptidase, die zur Herstellung von AIP benötigt wird. AgrC und AgrA bilden schließlich ein Zwei-Komponenten System mit AgrC als Membran-Histidin-Kinase und AgrA als Regulator [92]. Bindet AIP an den extracytoplasmatisch lokalisierten Rezeptorpart von AgrC, so kommt es zur Phosphorylierung von AgrA, welches seinerseits nun die P2- und P3-Promotoren aktiviert, was letztlich zur Autoaktivierung des *agr*-Systems und zur Heraufregulierung der RNA III Transkription führt [61]. Diese RNA III erhöht die Synthese von sekretorischen Virulenzfaktoren und unterdrückt die Produktion der oberflächenassoziierten Proteine [71]. Dabei fungiert RNA III hauptsächlich als „antisense“-RNA, die an *agr*-regulierte RNAs, wie zum Beispiel *hla*, welches für das α -Hämolysin kodiert, bindet [5, 35]. Die Regulation von Genen durch das *agr*-System kann auf verschiedene Arten geschehen, wie z.B. durch direkte AgrA Bindung, eine positive RNA III Reaktion durch Bindung an Ziel mRNAs oder indirekt durch RNA III vermittelte Inhibierung der Translation des „repressor of toxins“ (Rot) [92]. RNA III hat zudem eine weitere Funktion, sie kodiert zudem für das Delta Hämolysin [96]. Weitere wichtige regulatorische Faktoren der Virulenzfaktorproduktion sind die „staphylococcal accessory regulator“ (*sar*) Loci [10]. Dabei handelt es sich um eine Familie kleiner DNA-Bindeproteine, deren wichtigster Vertreter SarA ist. Der *sarA*-Lokus beinhaltet drei Promotoren (P1, P2, P3), von denen jeder ein Transkript von SarA herstellen kann, welches von großer Bedeutung für die Virulenzfaktor-Regulation ist. Die Inaktivierung von *sarA* führt zu einer Hemmung der α -Hämolysin (*hla*)-Synthese und einer vermehrten Expression von Protein A (*spa*) [10]. Weiterhin reguliert SarA auch die Transkription von *agrBDCA* und der RNA III [55]. Einen weiteren wichtigen Regulator in der SarA-Familie stellt der zuvor erwähnte Regulator Rot dar. Rot hat unter anderem die Fähigkeit, viele sekretierte Virulenzfaktoren, extrazelluläre Proteasen, Ureasen und Lipasen herunter zu regulieren. Andererseits wird die Transkription von anderen Virulenzfaktoren, wie Protein A, Koagulase und dem Clumping Faktor B

heraufreguliert [80, 93]. Des Weiteren hat Rot Einfluss auf viele andere Vorgänge in der Zelle, wie dem Stofftransport, dem Aminosäuremetabolismus und der Zellwand-Biosynthese [18, 80]. In Staphylokokken gibt es zudem vier Sigma Faktoren, welche als Untereinheit des RNA-Polymerase-Komplexes für die Erkennung von Promotoren und die Initiierung der Transkription von Bedeutung sind. Dabei ist der „house-keeping“ Sigmafaktor σ^A verantwortlich für die Transkription der meisten Gene, während σ^H für einige Kompetenzgene und σ^B , welcher unter Stressbedingungen und Änderungen der Wachstumsphasen aktiviert wird, für die Regulation einer Reihe von Virulenzfaktoren von Bedeutung ist [74]. Eine wichtige Rolle kommt außerdem dem „catabolite control protein A“ (CcpA) zu, welches zur GalR–LacI Repressor Familie gehört. CcpA wird in Gegenwart von Glukose aktiviert [82], führt zu einer verminderten Synthese der Bakterienkapsel und fördert über die Repression des TCA-Zyklus die Biofilmbildung [79]. Das Zwei-Komponenten System Sae reguliert die Expression von vielen Exoproteinen, wie dem α -Hämolysin und der Koagulase. Bei den Zwei-Komponenten Systemen, die typischerweise aus einer Sensor Histidinkinase (HK) und einem „response regulator protein“ (RR) bestehen, handelt es sich um Signaltransduktionsmechanismen, durch die die Bakterien auf extrazelluläre Stress-Signale reagieren können [91]. Abgesehen von den bisher genannten Regulatoren wird die Virulenzfaktorproduktion auch zeitweise durch den globalen Energiehaushalt des Bakteriums reguliert [60].

2.4.3 **Small Colony Variants (SCV): Persistente Erreger mit einem defizienten TCA-Zyklus**

Small colony variants (SCV) einer Bakterienart zeichnen sich vor allem morphologisch durch eine Koloniegroße aus, die etwa einem Zehntel der normalen Größe entspricht. Erstmals wurden sie 1910, als eine aberrante Form von *Salmonella enterica* beschrieben [69]. Seitdem wurde der SCV Phänotyp bei vielen verschiedenen Bakterienarten, so z.B. auch *S. aureus* und *S. epidermidis*, nachgewiesen. Klinisch gesehen verursachen SCVs rezidivierende und

persistierende Infektionen, die auch antibiotisch nur schwer anzugehen sind. Klinische Isolate von *S. aureus* SCVs zeigen die Besonderheit, dass sie auxotroph für Substrate wie Menadion, Hämin, Thiamin oder Thymidin sind [69]. Eine wichtige klinische Bedeutung kommt dabei den Thymidin-abhängigen SCVs (TD-SCV) zu, die die häufigsten SCVs darstellen, die u.a. bei Mukoviszidose-Patienten aus den Luftwegen isoliert werden können. Generell zeigen vor allem Kinder und Jugendliche mit Cystischer Fibrose (CF) eine hohe Besiedelungsrate sowohl mit der Wildtypform als auch der SCV-Form von *S. aureus* [38]. SCVs werden vor allem deshalb mit persistierenden und rezidivierenden Infektionen in Verbindung gebracht [69, 83], da sie ein erhöhtes intrazelluläres Überleben und ein reduziertes Ansprechen auf antibiotische Therapie zeigen [2, 38, 97]. In vitro zeigen SCVs ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zu isogenen Bakterienstämmen. Die *lag*-Phase dauert bis zu 8 Stunden, was der exponentiellen Phase normaler Bakterien entspricht. Anschließend kommt es auch hier zu einer Zunahme der Zelldichte und der vitalen Zellen. Verglichen mit morphologisch normalen *S. aureus* Stämmen bleibt die Zelldichte im Medium jedoch sehr gering. Trotz dieser anfänglichen Defizite im Wachstum besitzen SCVs im Langzeitüberleben einen relativen Überlebensvorteil um das 41-fache, da sie ein verzögertes Eintreten in die Absterbephase aufzeigen. Diese Absterbephase ist bei *S. aureus*-Wildtypen nach einem etwa 24 stündigem Wachstum zu beobachten und hat ein rasches Abnehmen der lebensfähigen Zellen zur Folge [7].

2.4.4 Morphologische und metabolische Besonderheiten von VRSA und VISA

MRSA sind bedeutende Erreger von nosokomialen Infektionen, die standardmäßig mit Vancomycin behandelt werden [90]. Die Effektivität dieser Therapieoption nimmt allerdings mittlerweile durch das Aufkommen von VISA und VRSA ab. Glykopeptidantibiotika wie Vancomycin wirken bakterizid durch Hemmung der Zellwandsynthese. Sie binden an das d-Alanyl-d-Alanin-Ende von

Pentapeptidvorläufern des Peptidoglycans, dem sogenannten Lipid 2, wodurch es zu einer Blockierung der Transglykosilierung und Transpeptidation kommt [67]. Die erhöhte Resistenz gegen Vancomycin ist dabei vergesellschaftet mit einer Veränderung im Wachstumsprofil, der Physiologie [54] und der Morphologie [16, 84] der Bakterien. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass VISA Stämme eine geringere Wachstumsrate und Zellgröße besitzen, sowie eine dickere Zellwand [16, 30, 84] als isogene Stämme mit einer geringeren Vancomycinresistenz [54]. Die dickere Zellwand resultiert dabei aus einer verstärkten Biosynthese von Peptidoglykanen, die zu einer Zunahme von nicht quervernetzten d-Alanyl-d-Alanin Seitenketten führt. Die Glykopeptide können an der Außenseite der Zellwand an diese Ketten gebunden werden, sodass letztendlich weniger Antibiotikum weiter nach innen diffundieren und sein Zielmolekül an der Membran erreichen kann [20]. Die High-Level Vancomycin-Resistenz bei den VRSA's wird hingegen durch das *vanA*-Gen vermittelt, welches wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer aus Enterokokken aufgenommen wurde [99]. In diesen Bakterien kommt es zur Produktion einer veränderten Peptidoglycan-Vorstufe, die mit d-Lac endet. Durch die Ligase VanA entstehen d-Ala-d-Lac Depsipeptide, die die normalerweise vorkommenden d-Ala-d-Ala-Dipeptide in der Peptidoglycan-Synthese ersetzen. Hierdurch wird die Affinität der späteren Peptidoglycan-Vorstufen für Glykopeptide stark vermindert [67]. Die Veränderungen der Morphologie bei den VISA Stämmen entsprechen dem Verhalten der Wildtypen von *S. aureus* nach Eintreten in die stationäre Wachstumsphase, nachdem bestimmte Nahrungsquellen aufgebraucht sind [85]. Diese Wachstumsphase ist gewöhnlicherweise dadurch gekennzeichnet, dass der TCA-Zyklus induziert wird und es zum Katabolismus von nicht bevorzugten Kohlenstoffquellen kommt. Nelson und Kollegen [58] konnten anhand von isogenen Stämmen mit jeweils hoher und niedriger Vancomycinresistenz zeigen, dass der Übergang von einer niedrigen zu einer hohen Vancomycinresistenz mit einer Abnahme der Aconitase-Aktivität assoziiert ist. Schon bei den parenteralen Stämmen mit einer intermediären Vancomycinresistenz zeigte sich bei verschiedenen Stämmen eine deutliche Korrelation zwischen einem eingeschränkten Acetatkatabolismus und des VISA Phänotyps [58]. So besitzt die

Mehrzahl der VISA-Stämme einen eingeschränkten Acetatkatabolismus. Dagegen ist dies nur bei einem sehr geringen Anteil von Vancomycin-empfindlichen *S. aureus* (VSSA) der Fall. Eine mögliche Erklärung für den verminderten Acetatkatabolismus von VISA-Isolaten findet sich in der bereits erwähnten Veränderung der Morphologie dieser Stämme. Besonders hervorzuheben ist hier die bereits erwähnte Verdickung der Zellwand [16, 30, 84], die mit einer vermehrten Expression von Genen für die Zellwandsynthese und -regulation einhergeht [52]. Infolgedessen besteht ein erhöhter Bedarf an N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetyl-Muramin, beides Bestandteile der Zellwand, die aus β -D-Fruktose-6-Phosphat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, synthetisiert werden. Bei einem Mangel an Glukose kann β -D-Fruktose-6-Phosphat ebenfalls im Rahmen der Glukoneogenese aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des TCA-Zyklus hergestellt werden. Dies hat allerdings zur Folge, dass Oxalacetat aus dem Zitratzyklus abgezogen wird, wo es zur Umwandlung von Acetyl-CoA in Zitrat benötigt wird. Zur weiteren Aufrechterhaltung des Zyklus sind daher anaplerotische, d.h. dem Zitratzyklus zuliefernde Reaktionen von Nöten, die limitierend wirken können, wenn keine Kohlenstoffe mehr verfügbar sind. In Abhängigkeit davon, wieviel Oxalacetat dem TCA-Zyklus noch zur Verfügung steht, kommt es zu einer Verlangsamung oder sogar zu einem Sistieren des Zitratzyklus [58, 85]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Transkription des *cidABC*-Operons, das von Bedeutung für die Regulation der Murein-Hydrolase-Aktivität und die Penizillinempfindlichkeit ist, beeinflusst wird [74] und dass die PIA-Produktion in Stämmen mit einer hochgradigen Vancomycinresistenz und einem vermindertem Acetatkatabolismus erhöht ist [58].

2.4.5 ClpC

Die „caseinolytic peptidase“ (Clp)-Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der Energie-abhängigen Proteolyse, einem Mechanismus, der besonders unter Stressbedingungen für die intrazelluläre Homöostase und Regulation von Bedeutung ist [26]. Während solchen Stressbedingungen, wie etwa einem

niedrigem pH-Wert oder bei Hitze, kommt es oftmals dazu, dass sich Proteine entfalten und aggregieren und so ihre Funktionalität verlieren [24]. Diesen Prozessen wirken Bakterien unter anderem damit entgegen, dass sie unter solchen Bedingungen Chaperone und Proteasen bilden, mit deren Hilfe entartete Proteine zerlegt und neu gefaltet, aber auch vollständig degradiert werden können, falls der Schaden am falsch gefalteten Protein zu groß ist. In diesem Zusammenhang besitzen die Clp-ATPase/Clp-Protease-Komplexe die Funktion der Qualitätskontrolle [8]. ClpC, ein Klasse III Hitzeschockprotein, welches zur Hsp100/ClpATPase-Familie gehört, stellt dabei ein wichtiges Element im System der Stressantwort von *S. aureus* dar. So wurde gezeigt, dass ClpC die Aconitase-Aktivität in *S. aureus* stabilisiert; die Reduktion von funktionellen ClpC führt dabei zu einer Verminderung der Aconitase-Aktivität und zu einem verlängerten Langzeitüberleben [6]. Die Familie der Clp Proteine lässt sich in 2 Klassen einteilen. Zur Klasse I gehören ClpA, ClpB, ClpC und ClpL, diese besitzen jeweils zwei ATP Bindungsstellen, ATP-1 und ATP-2 und haben eine Größe von 70 bis 110 kDa. Die Klasse II Clp-Proteine lassen sich in ClpX und ClpY unterteilen, sie sind kleiner und besitzen nur eine ATP Bindungsstelle [81]. Der Clp-Proteinkomplex besteht aus einer proteolytischen Untereinheit, dem ClpP, welches mit der Clp-ATPase assoziiert ist. Hierbei bilden 14 ClpP-Serinproteasen, die in 2 heptamerische Ringe aufgeteilt sind, den proteolytischen Kern, welcher wiederum eine Kammer bildet, in dessen Inneren sich die aktiven Zentren befinden. Dieser Aufbau ähnelt dem der eukariotischen Proteasomen [39]. Wenn die Clp-ATPase nicht mit ClpP assoziiert ist, besitzt sie eine substratspezifische Chaperonfunktion, wohingegen erst durch das Zusammenspiel beider Proteine eine Protease-Aktivität entsteht. ClpP formt dabei zusammen mit ClpC die ClpC-Protease [94].

1.1. Fragestellungen

1. Lassen sich auch aus normalen klinischen Subpopulationen Bakterien mit einer verminderten Aktivität des TCA-Zyklus isolieren und wie hoch ist ihr Anteil an der Gesamtpopulation? Gibt es diesbezüglich Unterschiede zwischen den einzelnen Staphylokokken-Spezies?
2. Lassen sich diese Bakterien einer bestimmten Infektionsart oder einem Infektionsort zuordnen?
3. Zeigen klinische Stämme mit einer verminderten TCA Zyklus-Aktivität Anzeichen, die auf eine höhere Persistenz hindeuten?
4. Zeigt sich bei diesen klinischen Stämmen eine veränderte Vancomycin-Empfindlichkeit?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Bakterienstämme

3.1.1.1 *Staphylococcus aureus* DSM 20231

Hierbei handelt es sich um einen Laborstamm, hinterlegt bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ in Braunschweig, von dem bekannt ist, dass er gute Fähigkeiten zur Biofilmbildung besitzt. Zusätzlich wurde eine *clpC*-Mutante dieses Stammes verwendet (PBM 001). Da es sich bei diesen Stämmen um ein isogenes Paar handelt und PBM 001 keine TCA-Zyklus-Aktivität besitzt, wurden sie für die Vorversuche, insbesondere zur Austestung von Phenolrot, als geeignetem Indikator, verwendet.

3.1.1.2 *Staphylococcus aureus* SH 1000

Bei diesem weiteren Laborstamm existiert ebenfalls eine *clpC*-Mutante (HCH 001). Da es sich bei diesen Stämmen auch um ein isogenes Paar handelt und HCH 001 ebenfalls eine verminderte TCA Zyklus Aktivität besitzt, wurden sie für die Vorversuche als weitere Kontrolle verwendet.

3.1.1.3 Klinische Proben

Des Weiteren wurden diverse klinische Staphylokokken-Stämme, die am Universitätsklinikum des Saarlandes im Zeitraum Februar 2008 bis August 2008 aus Patientenproben entnommen wurden, untersucht. Hierbei handelt es sich um Blutkulturen, Wund- und Sekretabstriche.

3.1.2 Verwendete RT-PCR Primer

Tabelle 1 zeigt die Verwendenden RT-PCR Primer

S. epidermidis

<i>citB</i> f1	5' CAC TCT TTA CCA CAA GGC TCA ACA 3'
<i>citB</i> r1	5' CGA AGA ATT CAA CAA ATT TTC CAA 3'
<i>clpC</i> f1	5' CAT TAG AAC GTC GTT TTC AAC CAA 3'
<i>clpC</i> r1	5'TGA TGA GCC TCA TAA CGG TCA C 3'
<i>acsA</i> f1	5' AGA ATG GAC TCC ACA CCC ACT TT 3'
<i>acsA</i> r1	5' TTA CAA ATG GCA CCA AAA CAT TG 3'
<i>gyrB</i> f1	5' CTA ATG CTG ATT TAC GAC GCG TAA 3'
<i>gyrB</i> r1	5' TCT GTA GGA CGC ATT ATT GTT GAA A 3'

S. aureus

<i>citB</i> f1	5' CAT TAC CAC AAG GCG CAA CA 3'
<i>citB</i> r1	5 ' GAA CTC CAC AAA TTT ACC AAC AAC A 3'
<i>clpC</i> f1	5 'GAA GAA GCA ATT CGT TTA AAT CAT TCA 3'
<i>clpC</i> r1	5 'CTT TCT AAT ACT TTT GCA GCA ATT CCT T 3'
<i>acsA</i> f1	5 'AAG ATA TGC AAC GGT TAT CTA ATA AAG CA 3'
<i>acsA</i> r1	5 'AGG TGT ACG CGA CAT AAA TAT AAA TAC TCT 3'
<i>gyrB</i> f1	5 'GAC TGA TGC CGA TGT GGA 3'
<i>gyrB</i> r1	5 'AAC GGT GGC TGT GCA ATA 3'

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 2 zeigt eine Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Phenolrot	
KOH 1M	
NaCl 0,9% in dest. Wasser	
Bacto Tryptic Soy Broth (TSB)	BD (Heidelberg)
– Pankreatisch abgebautes Casein 17,0 g/l	
– Enzymatisch abgebautes Sojamehl 3,0 g/l	
– Dextrose 2,5 g/l	
– Natriumchlorid 5,0 g/l	
– Dikaliumphosphat 2,5 g/l	
Tryptic Soy Agar (TSA) +5% Schafblut	BD
– Pankreatisch abgebautes Casein 15,0 g/l	
– Enzymatisch abgebautes Sojamehl 5,0 g/l	
– Natriumchlorid 5,0 g/l	
– Gelose	
Müller-Hinton Agar	BD
– Rindfleischextrakt 2,0 g/l	
– Hydolysiertes Casein 17,5 g/l	
– Stärke 1,5 g/l	
– Agar 17,0 g/l	

HPLC Wasser

BHI Medium

BD

- Hirn-Herz-Infusion (Frischgewebe) 6,0 g/l
- Peptisch abgebautes Tiergewebe 6,0 g/l
- Pankreatisch abgebautes Casein 14,5 g/l
- Natriumchlorid 5,0 g/l
- Glucose 3,0 g/l
- Dinatriumhydrogenphosphat 2,5 g/l

RNase freies Wasser

Quiagen

Fluorcitrat

RNeasy Mini Kit (50)

Quiagen

SYBR Green

ABI

RNase free DNase

Quiagen

Modified Lowry Protein Assay

Propidiumjodid

0,9% NaCl

Ethanol 100%

Ethanol 70 % zur Sprühdesinfektion

LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit

Invitrogen

3.1.4 Laborgeräte

3.1.4.1 Brutschrank

In einem Brutschrank (Typ 5000, Heraeus, Hanau) wurden die auf Blutagar, bzw. die auf MH-Agar ausgestrichenen Kulturen bebrütet.

3.1.4.2 Schüttler

Die Kulturen für das Screening und die Versuchskulturen wurden in einem Schüttelinkubator System (Multitron II, Infors, Einsbach) inkubiert.

3.1.4.3 Photometer

Die Bestimmung der optischen Dichte der Übernacht- und Versuchskulturen und der Bestimmung der RNA-Menge erfolgten mit dem Photometer Gene Quant Pro der (Amersham, Freiburg).

3.1.4.4 Zentrifuge

Die Zentrifugation der Proben erfolgte in dem Modell Z233 Mk-2 (Hermle).

3.1.4.5 Vortexer

Zum Mischen der Proben wurde der Vortex Genie (Beender&Hobein Ag) verwendet.

3.1.4.6 Steril-Werkbank

Die Versuche fanden unter sterilen Bedingungen unter Nutzung der Steril-Werkbank Hera Safe (Heraeus) statt.

3.1.4.7 PCR-Gerät

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurden im Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt.

3.1.4.8 Real Time PCR Gerät

Die Expressionsanalyse erfolgte in dem RT-PCR System ABI 7000 (Applied Biosystems).

3.1.4.9 Fluoreszenzmikroskopie

Als Mikroskop diente das Modell Axioskop (Zeiss).

3.2 Methoden

3.2.1 Screening

3.2.1.1 Anzüchten der Bakterien

Die Kulturen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C auf Blutagar angezüchtet.

3.2.1.2 Phenolrot-Screening

Phenolrot, bzw. Phenolsulfonphthalein gehört zur Gruppe der Sulfonphthaleine. Es ist ein wasserlöslicher, kristalliner pH Indikator, der bei einem pH Wert $<6,6$ gelb, bei einem pH zwischen 7,4 und 8,0 rot und ab einem pH $>8,0$ violett erscheint.

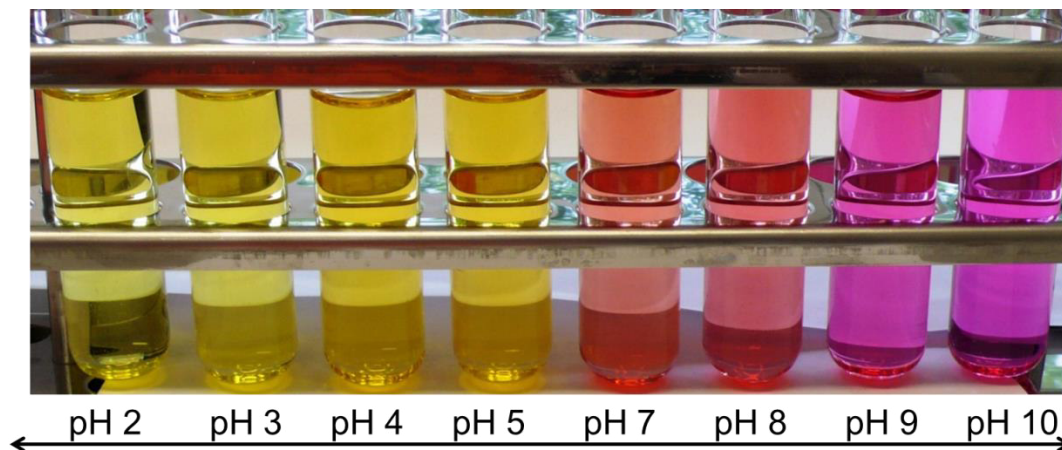


Abbildung 3: Darstellung des Farbspektrums von Phenolrot bei aufsteigenden pH Werten

Das Phenolrot Screening ist eine von Somerville et al. [36] etablierte und von uns modifizierte Methode. Alle Bakterienkulturen wurden in diesem Assay in Tryptic Soy Broth (TSB) mit 0,1% Phenolrot angezüchtet. Zum Erreichen von aeroben Wachstumsbedingungen erfolgten die Versuche stets unter einem Medium-Gefäß Verhältnis von 1:10. Mit einer sterilen Plastiköse wurde eine Kolonie von der entsprechenden Blutagarplatte abgetragen und in das Medium eingerührt. Die Bakterienkulturen wuchsen für 15 Stunden im Schüttler bei 37°C und 230 rpm. Anschließend wurde für jeden Stamm einmalig die optische Dichte gemessen und der Farbumschlag dokumentiert. Der Farbumschlag kommt dabei durch eine Änderung des pH Wertes im Medium zu Stande. Zu Beginn hat das Medium einen neutralen pH Wert und damit eine rötliche Verfärbung. Im weiteren Wachstumsverlauf kommt es zunächst einer Ausschleusung des während der Glykolyse entstandenen Acetat ins Medium, wodurch es zu einem pH-Abfall und damit zu einer gelblichen Färbung des Mediums kommt. In Stämmen mit einem funktionsfähigen TCA-Zyklus kommt es nach etwa 6 Stunden, wenn die präferierten Kohlenstoffquellen verbraucht sind, zu einem Rücktransport des

Acetats in das Bakterium. Infolgedessen resultiert ein pH Anstieg und eine rot-violett Verfärbung des Mediums. Der im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt höhere pH-Wert kommt zudem auch durch Abfallprodukte des Zitratzyklus wie Ammoniak zustande. In Stämmen mit einem verminderten oder sogar nicht vorhandenen Zitratzyklus ist nach 15 Stunden Wachstumszeit noch eine große Menge Acetat im Medium. Dieses bleibt aufgrund des niedrigen pH Wertes gelb.

3.2.1.3 Archivieren der gesammelten Bakterienstämme

Gleichzeitig mit dem Phenolrot-Screening wurde jeweils von einer Blutagarplatte eine Kolonie in 2 ml TSB in 15 ml Glasröhrchen inkubiert. Auch hier erfolgte das Wachstum im Schüttler für 15 h bei 37°C und 230 rpm. Anschließend wurden 100µl der Kultur zusammen mit 900 µl BHI/20% Glycerin in ein Kryo-Tube gegeben und bei -70°C eingefroren.

3.2.2 Bakterienkulturen

3.2.2.1 Anzüchten der Bakterien aus der Glycerin-Kultur

Die benötigten Bakterien wurden mit einem sterilen Glasstab aus der Glycerin-Kultur entnommen und mittels 3-Ösen-Ausstrich auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Das Anzüchten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

3.2.2.2 Herstellen einer Bakteriensuspension

Um die Anzahl von Transfers und damit möglicherweise einhergehenden Änderungen des Phänotyps möglichst gering zu halten, wurde auf das Anlegen einer Übernachtskultur verzichtet. Ca. 10 Kolonien wurden mit einer sterilen Plastik-öse von der Blutagarplatte entnommen und in 1 ml TSB in 2 ml Reaktionsgefäße eingerührt, für ca. 1 Minute auf höchster Stufe gevortext und anschließend die

optische Dichte mit Hilfe des Photometers bei einer Verdünnung von 1:10 mit TSB bestimmt. Zuvor erfolgte die Eichung des Photometers mit 1 ml TSB bei 600 nm.

3.2.2.3 Anlegen einer Versuchskultur

10 ml TSB wurden in einen 100 ml Kolben gegeben. Nach Berechnung der notwendigen Menge an Bakteriensuspension, die dem oben genannten Volumen zugegeben werden muss, um eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,01 zu erreichen, wurde diese in den Kolben gegeben und im Schüttler bei 230 rpm und 37°C für 30 Stunden inkubiert.

3.2.3 Bakterienwachstum

Während der ersten 12 Wachstumsstunden wurden alle 2 Stunden unter sterilen Bedingungen 100 µl Bakteriensuspension aus der Versuchskultur entnommen. Diese wurden zusammen mit 900 µl TSB in ein Reaktionsgefäß gegeben und für ca. 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Die so erstellte Suspension wurde in eine Plastikkuvette pipettiert und im Photometer im Zellkulturprogramm bei einem Verdünnungsfaktor von 1:10 und einer Wellenlänge von 600nm gemessen. Vor der eigentlichen Messung erfolgte die Kalibrierung des Gerätes mit 1 ml TSB.

3.2.4 CFU-Determination

3.2.4.1 Verdünnungsreihe

Aus der Versuchskultur wurden zu den Zeitpunkten 6, 10 und 30 Stunden unter der Sterilbank jeweils 1 ml Bakteriensuspension entnommen. Diese wurden für ca. 1 Minute auf höchster Stufe gevortext, dann erfolgte unter sterilen Bedingungen die Erstellung einer Verdünnungsreihe. Hierfür wurden aus dem Reaktionsgefäß

100 µl entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit 900 µl TSB gegeben. Nach erneutem Vortexen für ca. 1 Minute wurden aus diesem wiederum 100 µl entnommen und in 900 µl TSB pipettiert. Dieser Vorgang wiederholt man, bis für jeden Bakterienstamm die Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-8} erreicht wird.

3.2.4.2 Ausstreichen auf Agar

Nach Erstellen der Verdünnungsreihe und erneutem Vortexen der Reaktionsgefäße wurden pro Verdünnungsstufe jeweils 100 µl der Bakteriensuspension auf eine Müller-Hinton-Agar-Platte pipettiert und somit die Verdünnungsstufen 10^{-7} - 10^{-9} erzielt. Anschließend erfolgte mittels eines Glasstäbchens das Ausstreichen der jeweiligen Verdünnungsstufen. Die Platten wurden anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.2.4.3 Bestimmung der Bakterienzahl

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgte nach 24 Stunden durch Auszählen der Kolonie-bildenden Einheiten pro ml (CFU/ml) auf den Agarplatten. Aus den drei Verdünnungsstufen wurde abschließend ein Mittelwert gebildet.

3.2.5 „Life-Death-Stain“

Nach 30 Stunden Wachstum wurden aus der Versuchskultur 200 µl entnommen und in ein Reaktionsgefäß pipettiert, bei höchster Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 300 µl steriler 0,9% NaCl Lösung resuspendiert und für eine Minute auf höchster Stufe gevortext. Nun erfolgte die Zugabe von jeweils 0,3 µl Propidiumjodid und SYTO® 9, einem grün fluoreszierendem Nukleinsäurefarbstoff, gefolgt von einem kurzen Vortexen für 5 Sekunden. Die Bakterien wurden anschließend für 10 Minuten im

Dunklen inkubiert, bevor 10 µl der Suspension auf einen Glasobjektträger aufgetragen und mit einem Deckplättchen abgedeckt wurden. Bei einer 1000-fachen Vergrößerung erfolgten im Fluoreszenzmikroskop bei verschiedenen Wellenlängen (500 nm für SYTO 9 und 635 nm für Propidiumjodid) die Photodokumentation und das anschließende Auszählen der toten und vitalen Zellen. Dabei erschienen die toten Zellen rot und die lebenden Zellen grün eingefärbt. Je Probe wurden dabei 2 Sichtfelder ausgewertet.

3.2.6 Gen-Expression

3.2.6.1 RNA-Extraktion

Aus der zuvor beschriebenen Versuchskultur wurden jeweils zu den Zeitpunkten 6 und 10 Stunden unter sterilen Bedingungen 2 ml Bakteriensuspension entnommen und in sterile 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Diese wurden sofort auf Eis gekühlt und bei 4°C und 6000xg für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Bakterienüberstand vorsichtig abpipettiert und das verbliebene Pellet in 1,2ml RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol durch Pipettieren resuspendiert. Dieser wurde anschließend in RNase freie Röhrchen mit Zink-Silizium (ZiSi) Kügelchen (Fast Prep FP120 instrument, Qbiogene, Heidelberg) gegeben, die der mechanischen Destruktion der Zellwand dienen. Das Aufschließen der Bakterienzellwand erfolgte im Ribolyser bei einer Geschwindigkeit von 6,5 für 35 Sekunden. Die Röhrchen wurden anschließend wieder umgehend auf Eis gelagert und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurden 700 µl des zellfragmentfreien Überstands vorsichtig in ein RNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert und die gleiche Menge an Ethanol hinzugefügt. Nach ca. 15 Sekunden vortexen wurden 700 µl der Lösung in „spin columns“ der Firma Qiagen pipettiert und für 15 Sekunden bei >8000xg bei 4°C zentrifugiert. Der im 2 ml Sammelrohr aufgefangene Durchfluss konnte verworfen werden, die restlichen 700 µl wurden in die „spin columns“ pipettiert und der vorherige Schritt wiederholt. Anschließend wurden zum Waschen zunächst 700 µl RW1 Puffer auf

das Säulchen pipettiert, dieses dann für 15 Sekunden bei mindestens 8000xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Austausch des Auffangröhrchens wurden 500 µl RPE Puffer in die spin columns pipettiert, die Röhrchen bei mindestens 8000xg für 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde mit einer Zentrifugationsdauer von 2 Minuten wiederholt und die Säulchen anschließend in neuen Auffangröhrchen gesteckt und für 1 Minute zentrifugiert, um sicherzustellen, dass kein Puffer mehr an den Säulchen anhaftete. Die Säulchen wurden abschließend in neue RNase-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt und 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säulchen pipettiert und für 1 Minute bei 8000xg zentrifugiert. Um die im Wasser gelöste RNA Menge zu vergrößern, wurde der Durchfluss erneut auf das Säulchen pipettiert und für 1 Minute zentrifugiert. Die gelöste RNA wurde bei -70°C eingefroren.

3.2.6.2 **Verdau von gDNA**

Die zuvor extrahierte RNA taute auf Eis langsam auf. In jedes Reaktionsgefäß wurden nun 20 µl RDD Puffer und 5 µl DNase I hinzugefügt. Um eine Gesamtmenge von 100 µl zu erreichen, wurden zusätzlich noch 25 µl RNase-freies Wasser gegeben und durch vorsichtiges Pipettieren miteinander vermischt. Nun erfolgte bei Raumtemperatur eine Inkubation für 2 Stunden, bevor 350 µl RLT-Puffer hinzugefügt wurden. Nach kurzem Vortexen erfolgte die Zugabe von 250 µl Ethanol und das Gemisch wurde durch vorsichtiges Pipettieren vermengt. Die jeweiligen Gesamtmengen von 700 µl wurden zügig in „spin columns“ gegeben und für 1 min bei 4°C und mindestens 8000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl RPE Puffer auf die Säulchenmembran gegeben und anschließend 1 Minute bei 8000xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss erneut verworfen und der Schritt mit 2-minütiger Zentrifugation wiederholt. Nach diesem Schritt wurde das Säulchen in ein neues 2 ml Auffangröhrchen gesteckt und für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, damit keine Pufferrückstände am Säulchen verbleiben. Abschließend

wurde das Säulchen in ein 1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß gesteckt, 50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und für 1 Minute bei 8000xg zentrifugiert. Der Durchfluss konnte anschließend erneut auf die Membran pipettiert und zentrifugiert werden. Das Säulchen wurde nach diesem Schritt entfernt und die in Lösung befindliche RNA im Reaktionsgefäß bei -70°C eingefroren.

3.2.6.3 Screening nach genomischer DNA zur Verifizierung der Reinheit der RNA

Nach dem DNA Verdau, wurden jeweils 2,5 µl der RNA Proben in einem ABI PRISM® 7000 SDS unter Verwendung des SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) und *gyrB* Primern amplifiziert und somit die Abwesenheit von DNA überprüft. Die Geräteeinstellungen waren dabei wie folgt:

	95°C	10 min
40 Zyklen	95°C	15 s
	60°C	1 min
	95°C	15 s
Schmelzkurve	95°C	15 s
	60°C	20 s
	95°C	15 s

3.2.6.4 Bestimmen des RNA-Gehaltes

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes wurden 2 µl der Probe in 78 µl RNase-freies Wasser geben und durch Pipettieren vermischt. Die Lösung wurde anschließend in eine Glasküvette zur RNA Bestimmung gegeben und mit dem Photometer unter dem RNA-Programm und einem Verdünnungsfaktor von 1:40 gemessen. Zuvor

erfolgten die Reinigung der Küvette mit EDTA und die Kalibrierung mit 80 µl RNase-freiem Wasser.

3.2.6.5 Umschreiben in cDNA

Zur Herstellung der cDNA wurden für jede Probe 2 µg RNA in 25 µl HPLC-Wasser in Reaktionsgefäße pipettiert. Die genaue µl Menge ergab sich durch Umrechnen der zuvor gemessenen RNA Menge. Die Mischung wurde dabei kontinuierlich in einer Eisbox gekühlt und anschließend 25 µl eines Mastermix bestehend aus folgenden Komponenten hinzugefügt:

10x RT-Puffer	2,5	µl
25x dNTP	1	µl
10 Random Hexamer	2,5	µl
RNase out	0,3	µl
MS-Reverse Transkriptase	1,25	µl
RNase freies Wasser	4,94	µl

Das Endvolumen betrug somit 50 µl und wurde durch vorsichtiges Pipettieren vermischt.

3.2.6.6 Real-Time PCR

Die cDNA wurde zur real-time Amplifikation mit spezifischen Primern (Tabelle 1) verwendet. Die Geräteeinstellungen waren dabei wie folgt:

	95°C	10 min
40 Zyklen	95°C	15 s
	60°C	1 min

Schmelzkurve	95°C	15 s
	60°C	20 s
	95°C	15 s

Der Level der mRNA Expression wurde gegen die interne Kontrolle, das Gen *gyrB*, welches konstitutiv expremiert wird , normalisiert. Die Menge der verschiedenen Transkripte wurde als die n-fache Differenz in Relation zum Kontrollgen ausgedrückt ($2^{-\Delta CT}$, wobei ΔCT den Unterschied im Schwellenwert für den Zyklus zwischen Ziel- und Kontrollgenen darstellt)

3.2.7 Bestimmen von Metaboliten im Bakterienüberstand

3.2.7.1 Vorbereitung der Versuchslösung

Aus der Versuchskultur wurden jeweils nach 6, 10 und 12 Stunden Wachstum 1 ml Bakteriensuspension entnommen und in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit für 1 Minute. Der Bakterienüberstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der pH-Wert des Überstandes wurde mittels pH-Messstäbchen bestimmt und durch Zugabe von KOH oder NaCl auf einen Bereich von 8,0-9,0 eingestellt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Probe in 990 µl HPLC Wasser in ein Reaktionsgefäß gegeben und anschließend gevortext, um einen Verdünnungsfaktor von 1:100 zu erreichen.

3.2.7.2 Acetat-Assay

Die Bestimmung der Acetatkonzentration aus dem oben erzeugten Überstand erfolgte mit einem Acetat UV-Test der Firma r-Biopharm. Diesem Test liegt

folgendes Prinzip zugrunde: Acetat wird in Gegenwart des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) mit Coenzym A (CoA) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Acetyl-CoA reagiert mit Oxalacetat bei Anwesenheit von Citrat-Synthase (CS) zu Citrat. Das, für diese Reaktion benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Indikatorreaktion aus L-Malat und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) gebildet. Dadurch wird NAD zu NADH reduziert. Die während dieser Reaktion umgesetzte Menge an NADH ist äquivalent zur Acetatmenge im Medium. Daher fungiert NADH, das aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt werden kann, als Messgröße. Zunächst wurde das Photometer mit 3 ml HPLC Wasser bei einer Wellenlänge von 340 nm kalibriert. In 3 ml Küvetten wurden je Probe 1,9 ml HPLC Wasser und 100 µl der oben vorbereiteten Versuchslösung pipettiert. Außerdem wurde eine Küvette, die später als Leerwert fungierte, mit 2 ml HPLC Wasser gefüllt. Nach Zugabe von 1 ml Triethanolamin-Puffer und 200 µl Lyophilisat (280 mg enthalten ca. 175 mg ATP, ca. 18 mg CoA und ca. 86 mg NAD) zu jeder Probe, erfolgte eine erste Messung der Extinktion (E_0). Anschließend wurde 10 µl einer Suspension aus L-MDH und CS hinzugegeben und nach dem Mischen erneut die Extinktion gemessen (E_1). Abschließend erfolgte 15 Minuten nach Zugabe von ACS die letzte Extinktionsmessung (E_2). Für Probe und Leerwert wurden die Extinktionsdifferenzen ($E_1 - E_0$) und ($E_2 - E_0$) berechnet. Zur Berechnung der ΔE_{Acetat} diente folgende Formel für vorgeschaltete Indikatorreaktionen, die von rBiopharm empfohlen wird.

$$\Delta E = \left[(E_1 - E_0)_{\text{Probe}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Probe}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Probe}}} \right] - \left[(E_1 - E_0)_{\text{Leerwert}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Leerwert}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}}} \right]$$

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration c gilt nun:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000}$$

V = Testvolumen (ml)

v = Probevolumen (ml)

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz (g/mol)

d = Schichtdicke (cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient für Acetat bei 340 nm ($l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Daraus ergibt sich für die vorliegende Versuchsanordnung folgende Formel, anhand derer die Acetatkonzentrationen für alle Werte berechnet wurden:

$$c = \frac{3,230 \times 60,05}{6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times [\Delta E]_{[g \text{ Acetat} / l \text{ Probelösung}]}$$

3.2.8 Aconitase Aktivitätsbestimmung

3.2.8.1 Enzymextraktion

Nach Ablauf von 6 und 10 Stunden wurden jeweils aus einer Versuchskultur an einer Sterilbank 2 ml Bakteriensuspension entnommen und in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt. Die Proben wurden umgehend auf Eis gelagert und für 10 Minuten bei 8000xg zentrifugiert. Nach Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 850 μ l ACN Puffer resuspendiert, für ca. 15 Sekunden auf maximaler Stufe gevortext und in Zink-Silizium (ZiSi) Röhrchen überführt. Hierbei diente das im ACN Puffer enthaltene Fluorcitrat der vollständigen Blockierung der Aconitase. Anschließend erfolgte das Aufschließen der Zellen im Ribolyser für 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,0. Die Röhrchen wurden sofort auf Eis gelagert und bei 4°C für 1 Minute mit max. Geschwindigkeit zentrifugiert. 400 μ l des Überstandes wurden jeweils vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C gelagert.

3.2.8.2 Enzymaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte auf Grundlage einer Änderung der

OD₂₄₀ bei Umwandlung von Isocitrat zu Citrat. Zunächst wurde jeweils ein Mastermix für Probevolumina von 50 µl und 100 µl hergestellt. Hierzu wurden je Probe 90 µl 1M Tris (pH8), 200 µl 100mM Isocitrat und 610 µl HPLC Wasser für die 100 µl Probe (bzw. 660 µl für die 50 µl Probe) in ein Gefäß pipettiert und für ca. 1 Minute auf höchster Stufe gevortext. Anschließend wurden von dem 100 µl Mastermix 900 µl in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und 100 µl des zellfreien Lysates aus dem Kühlschrank hinzugefügt. Das Gefäß wurde für ca. 10 Sekunden gevortext und der Inhalt dann sofort in eine UV-Küvette gegeben. Das im Mastermix enthaltene Isocitrat diente hierbei dazu, das Fluor-Citrat aus seiner Bindung mit der Aconitase zu verdrängen. Anschließend erfolgte die Messung im Photometer bei einer OD₂₄₀. Dazu wurde zunächst der Anfangswert notiert und die Probe dann für 10 Minuten gemessen und jede Minute der jeweilige Wert notiert. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde anschließend überprüft ob die Änderung über die 10 Minuten konstant war. War dies der Fall, so wurde der Mittelwert der jeweiligen Messdifferenzen ermittelt, indem die Absorption bei t=0 Minuten von der Absorption von t=10 Minuten subtrahiert und anschließend durch 10 dividiert wurde. Da für diesen Essay eine Unit (U) als eine Änderung der Absorption von 0,0033 definiert ist, wurde das so errechnete Ergebnis durch 0,0033 dividiert um die Enzymaktivität zu berechnen.

3.2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Enzymaktivität pro mg Protein bestimmen zu können, war es erforderlich, die Proteinkonzentration im Lysat zu bestimmen. Dies erfolgte mittels des modifizierten Lowry Protein Assays. Zunächst wurde eine Standardkurve mittels einer Verdünnungsreihe mit BSA in Tris 90 mM angefertigt. Jeweils 200 µl jeder Verdünnung, sowie ein Leerwert (Tris 90 mM) wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dann erfolgten die Zugabe des „modified Lowry Reagent“ und die anschließende Inkubation von exakt 10 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit wurden pro Reaktionsgefäß 100 µl 1xFolin-Cioltu Lösung hinzugegeben. Nach ca. 15 s Vortexen auf höchster Stufe erfolgte eine weitere Inkubation im Dunklen bei

Raumtemperatur für 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben im zuvor mit HPLC Wasser kalibriertem Photometer bei 740 nm gemessen. Die eigentlichen Proben wurden jeweils im Verhältnis 1:10, 1:20 und 1:40 mit Tris 90 mM verdünnt und genau wie die Proben der Verdünnungsreihe behandelt. Von allen gemessenen Extinktionen wurde die Differenz zum Leerwert gebildet. Die für die Standardkurve ermittelten Werte wurden in ein Koordinatensystem eingetragen und eine Regressionsgrade ermittelt. Anhand der Regressionsgrade erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben.

3.2.9 MHK-Bestimmung von Vancomycin

Die MHK-Bestimmung erfolgte mittels eines E-Tests der Fa. BioMérieux. Die Stämme wurden hierzu zunächst auf Blutagar ausgestrichen und über Nacht wachsen gelassen. Anschließend wurde eine Bakteriensuspension in 0,9% NaCl hergestellt und diese auf eine MacFarland Einheit von 2 eingestellt. Mittels eines sterilen Tupfers erfolgte das Ausstreichen auf BHI Agar. Abschließend wurde mit einer sterilen Pinzette ein Teststreifen aufgelegt. Nach der Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Werte abgelesen.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2007 für die Tabellenkalkulation und SPSS 15 für die statistische Auswertung. Diese geschah mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests. Als statistisch signifikant wurden dabei P-Werte $<0,05$ und als statistisch hoch signifikant P-Werte $<0,001$ gewertet. Die Berechnung einer Korrelation erfolgte mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuch: Überprüfen der Verwendbarkeit des Phenolrotfarbstoffes

In Vorversuchen sollte geklärt werden, ob und inwiefern der Phenolrotfarbstoff und somit auch der pH Wert als Indikator für einen reduzierten Acetatkatabolismus geeignet sind. Hierzu wurden die Laborstämme SH 1000 und DSM 20231 inklusive ihrer jeweiligen *clpC* Mutanten HCH 001 (SH1000 $\Delta clpC$) und PBM 001 (DSM 20231 $\Delta clpC$) verwendet, da bei Bakterien mit einem *clpC* Knockout ein eingeschränkter Acetatkatabolismus bekannt ist [1]. Als Versuchsmedien für die Flüssigkultur wurden zunächst Brain Heart Infusion (BHI) und Tryptic Soy Broth (TSB) verwendet, wobei sich im Laufe der Versuchsreihen BHI als ungeeignet für das Phenolrotscreening erwies, da es aufgrund des hohen Gehaltes an Aminosäuren in diesem Medium auch bei einem verminderten Katabolismus von Acetat zu einer so starken Alkalisierung des Mediums kam, sodass daraus generell eine Rotverfärbung resultierte. Daher konnte anhand der Färbung des Mediums hier kein Rückschluss auf den Acetatstoffwechsel gezogen werden. TSB hingegen erwies sich in den Vorversuchen (Versuchsbedingung siehe 3.2.1.2) als geeignet. Im Verlauf des Wachstums kam es hier zunächst bei allen Stämmen zu einer Gelbfärbung des Mediums; analog zur Ansammlung des unter aerobem Wachstums hergestellten Acetats im Rahmen des Glukose-Katabolismus. Im weiteren Wachstumsverlauf kam es nach 3 Tagen zu einer Rot/Pink-Verfärbung des Bakterienmediums der Stämme DSM 20231 und SH 1000. Das Medium der *ClpC* Mutanten hielt dagegen seine Gelbfärbung während des gesamten Versuchsaufbaus über eine Woche hinweg bei. Abschließend soll erwähnt werden, dass diese Stämme insgesamt einen langsameren Katabolismus besitzen als die im Folgenden aufgeführten klinischen Stämme.

4.2 Screening

4.2.1 Übersicht über die verschiedenen Staphylokokkenarten an der Universitätsklinik des Saarlandes (UKS) (Versuchsaufbau siehe 3.2.1.1)

In Rahmen dieser Versuche sollte die Verteilungshäufigkeit der einzelnen, am Universitätsklinikum des Saarlandes isolierten Staphylokokkenarten evaluiert werden. Die hierfür benötigten Informationen wurden anhand der in der Datenbank der Diagnostischen Abteilung hinterlegten Artbestimmung der einzelnen Bakterienproben erlangt. Die Identifizierung der Bakterien erfolgte hierbei mit einem in der Routinediagnostik verwendeten WalkAway® System

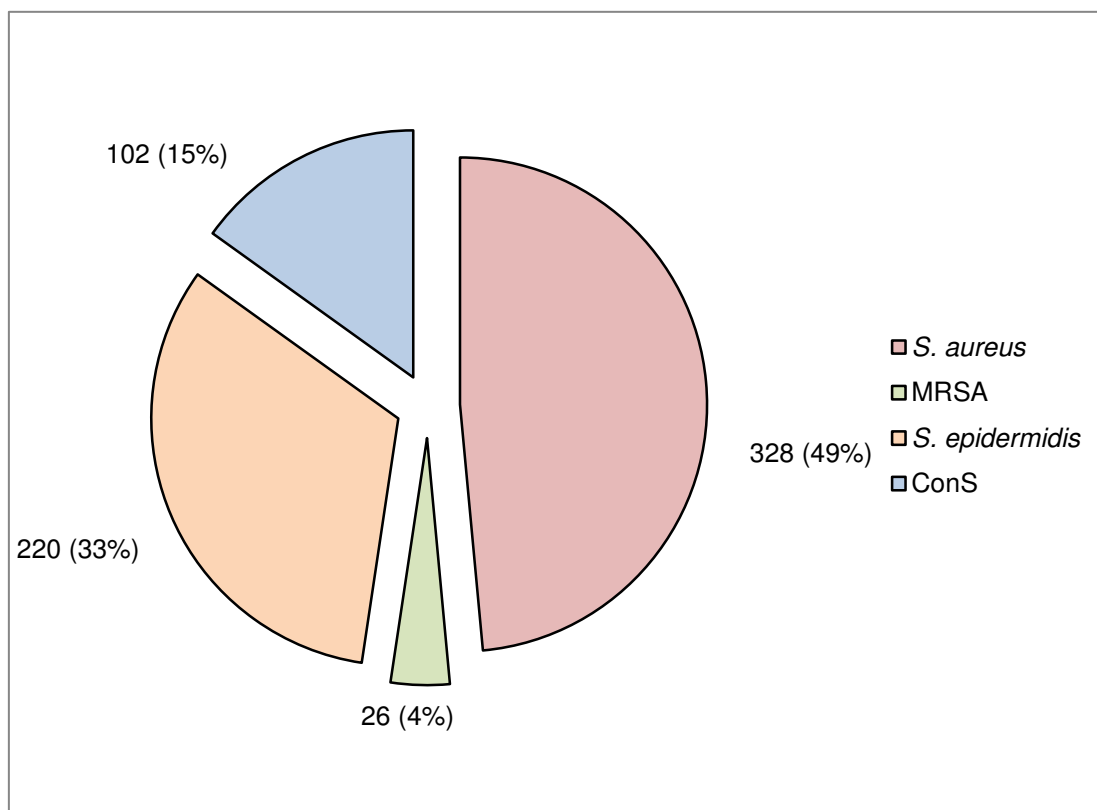


Abbildung 4: Relative Verteilung der im Zeitraum Februar 2008 bis August 2008 gesammelten Staphylokokkenproben an der UKS. Die Koagulase-negativen Staphylokokken (ausgenommen *S. epidermidis*) wurden zur besseren Übersicht in dieser Graphik zusammengefasst. Die Zahlen geben die absolute Anzahl der jeweiligen Staphylokokkenarten an, in Klammern findet sich der relative Anteil.

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Koagulase-negativen Staphylokokkenarten an der Universitätsklinik des Saarlandes. Die Staphylokokkenisolate entstammen aus Blutkulturen, Wundabstrichen sowie Sekreten und Urin. Der Anteil an der Gesamtpopulation ist als absolute Zahl und als relativer Anteil angegeben.

Spezies	Absolute Anzahl	Prozentualer Anteil (%)
<i>S. epidermidis</i>	220	32,54
<i>S. haemolyticus</i>	35	5,18
<i>S. hominis</i>	11	1,63
<i>S. capitis</i>	16	2,37
<i>S. lugdunensis</i>	4	0,59
<i>S. auricularis</i>	4	0,59
<i>S. simulans</i>	2	0,30
<i>S. warneri</i>	1	0,15
<i>S. xylosus</i>	1	0,15
<i>S. saprophyticus</i>	1	0,15
<i>S. intermedius</i>	1	0,15
Übrige CoNS	26	3,85

Erwartungsgemäß machte *S. aureus* (inklusive MRSA) mit 48,52% den größten Anteil der Staphylokokkenpopulation aus. Der Anteil an MRSA betrug dabei 7,93% bezogen auf die Gesamtmenge an *S. aureus* und 3,85% in Bezug auf alle gescreenten Bakterien. *S. epidermidis* hatte einen Anteil von 38,54 % an der Gesamtanzahl, und stellt damit den weitaus bedeutendsten Vertreter der Koagulase-negativen Staphylokokken dar.

4.2.2 Unterschiede im Wachstum bei den häufigsten Staphylokokkenarten

Ergänzend zu den Untersuchungen bezüglich der Verteilungshäufigkeit der verschiedenen Staphylokokkenarten sollten im Rahmen dieser Versuchsreihe die Unterschiede im Bakterienwachstum eruiert werden. Hierfür wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Als Messzeitpunkt wurden 15 Stunden nach Ansetzen der Kultur gewählt, da sich die Bakterien zu dieser Zeit bereits in der stationären Wachstumsphase befinden.

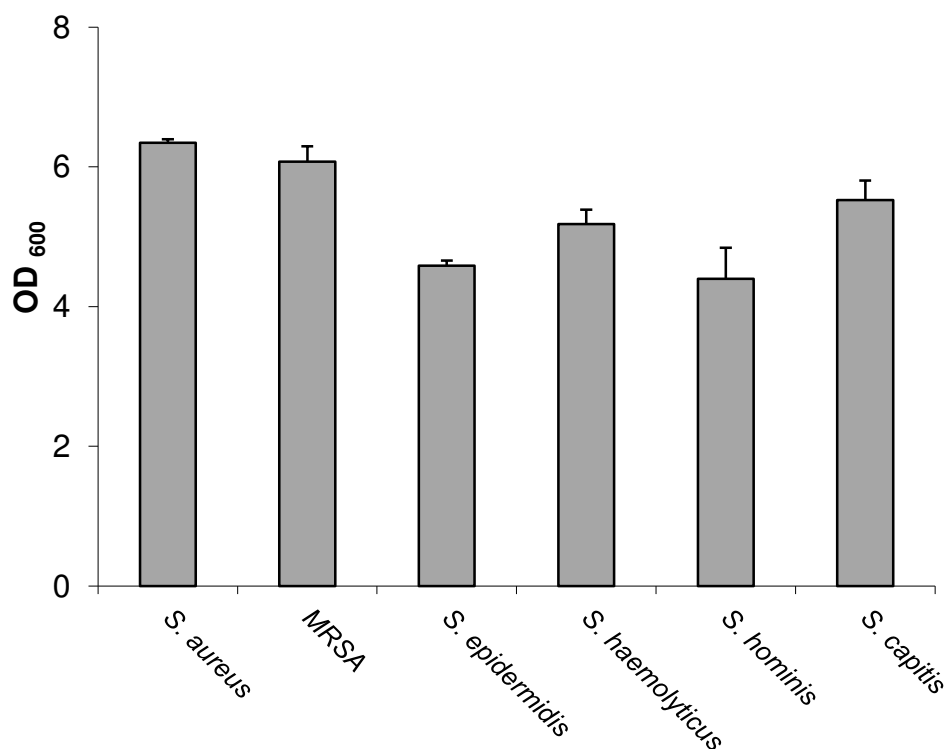


Abbildung 5 Absorptionen nach 15 Stunden Wachstum in TSB bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bei den häufigsten, im Laufe dieser Arbeit, isolierten Staphylokokkenarten.

Dabei wurden diejenigen Arten berücksichtigt, die einen Anteil von mindestens 1% an der erhobenen Gesamtpopulation hatten. Die Darstellung entspricht den jeweiligen Mittelwerten und den Standardfehlern.

Zwischen Methicillin-empfindlichen *S. aureus* und MRSA war nach 15 Stunden kaum ein Unterschied in der Bakteriendichte feststellbar. Die Koagulase-negativen Stämme zeigten dagegen durchweg ein geringeres Wachstum. Allerdings war bei

allen Stämmen eine gewisse Streubreite im Wachstum zu verzeichnen, als Hinweis auf unterschiedliche genetische Hintergründe und Diversität auch innerhalb der Arten.

4.2.3 Phenolrotscreening zur Identifikation von Stämmen mit einem eingeschränkten Acetatkatabolismus (Versuchsdurchführung siehe 3.2.1.2)

Im Rahmen dieser Versuche sollte festgestellt werden, ob es in den Staphylokokkenisolaten, die während des oben genannten Zeitraumes am UKS gesammelt wurden, Bakterienstämme gab, die einen verminderten Acetatkatabolismus besaßen. Als Screeningparameter wurde hierfür der pH-Wert des Mediums nach 15 Stunden Wachstum in TSB unter aeroben Bedingungen verwendet, da eine fehlende Rückresorption des Acetats aus dem Medium zu einer dauerhaften Ansäuerung führt. Dadurch kommt es zu einer gelblichen Verfärbung des Mediums. Diejenigen Stämme, bei denen solch eine Gelbfärbung des Mediums zu verzeichnen war, wurden im Folgenden als IACS (impaired acetate catabolizing strain) bezeichnet. Bei einem normalen Acetat-Katabolismus kommt es im verwendeten TSB Medium nach der vollständigen Verstoffwechselung der primären Kohlenstoffquelle (Glukose), aufgrund der Rückresorption des Acetats und der aus der Metabolisierung dieser Substanz entstehenden Stoffwechselprodukte zu einer Alkalisierung des Mediums, die zu einer Rotfärbung des pH-Indikators führt. Diese Stämme wurden im Folgenden als ACS (acetate catabolizing strain) bezeichnet. Als Cut-Off Point zur Entscheidung, welcher Gruppe ein Bakterienstamm zuzuordnen war, wurde eine Wachstumszeit von 15 Stunden bei hoch aeroben Bedingungen gewählt. Der Zeitraum entsprach, stationären Wachstumsphase, in der man bereits einen Acetat-Katabolismus in den Wildtypstämmen erwartet.

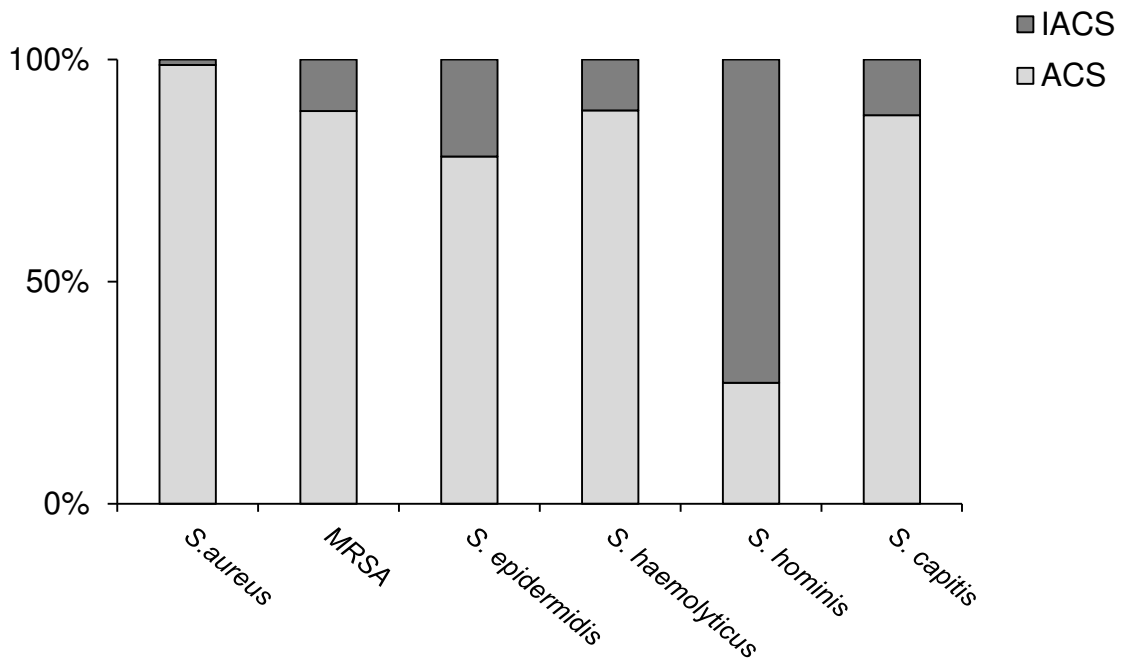


Abbildung 6: Ergebnisse des Phenolrot-Screenings (Wachstumszeit 15 Stunden bei 230rpm, 37°C): Prozentualer Anteil von IACS und ACS an der Grundgesamtheit der jeweiligen Bakterienarten.

Bei *S. aureus* zeigten nur ca. 1% (n=4) der gescreenten Stämme einen IACS Phänotyp nach 15 Stunden Wachstum. Bei MRSA dagegen hatten ca. 12 % (n=3) einen Phänotyp, der auf einen verminderten Acetat-Katabolismus hinwies. Die Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS) zeigten eine höhere Anzahl an Stämmen mit einem IACS Phänotyp. So fand sich bei *S. epidermidis* in ca. 22% (=48) der Stämme ein IACS Phänotyp. Bei *S. haemolyticus* waren es 11% (n=4) und bei *S. capitis* 13% (n=2). Bei *S. hominis* wiesen sogar 73% (n=8) der gescreenten Stämme einen verminderten Acetatkatabolismus auf.

4.2.4 Unterschiede im Wachstum verschiedener Bakterienarten mit eingeschränktem Acetatkatabolismus versus normalem Katabolismus

Im Rahmen dieser Versuche sollte überprüft werden, ob es nach 15 Stunden Wachstum generell einen Unterschied in der Bakteriendichte zwischen den

Stämmen mit eingeschränktem und normalem Acetatkatabolismus gab. Zusätzlich wurde der gleiche Sachverhalt für die 6 in dieser Arbeit häufigsten Bakterienarten. Abbildung 7 veranschaulicht die Unterschiede in den jeweils gemessenen Bakterienkonzentrationen.

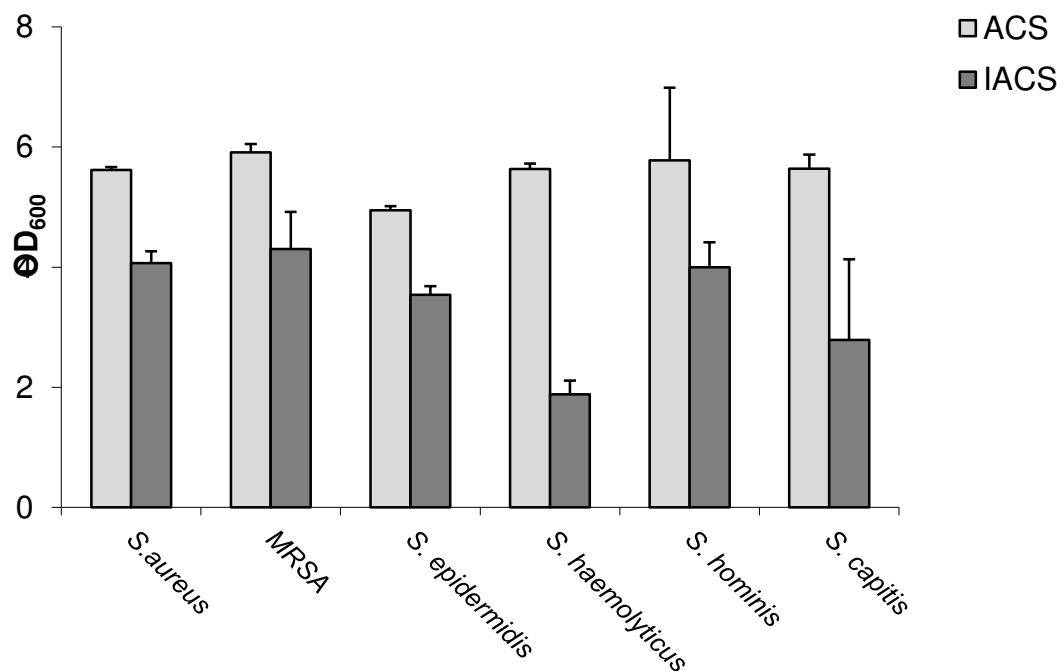


Abbildung 7 Unterschiede in der Bakteriendichte nach 15 Stunden Wachstum (OD₆₀₀).
Angabe der Werte als Mittelwerte und Standardfehler.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Bakterienarten zeigte sich durchgängig eine höhere Bakteriendichte in den Stämmen vom ACS Phänotyp. Der Unterschied in der Bakteriendichte war abgesehen von *S. hominis* in allen anderen Bakterienarten statistisch signifikant, wie in der folgenden Tabelle zu entnehmen ist.

Tabelle 4: Vergleich der Bakteriendichte nach 15 Stunden Wachstum bei stark aeroben Bedingungen (230 rpm, 37°C)

Zeit	Mittelwert (OD 600) ¹		p-Wert
	ACS	IACS	
<i>S. aureus</i>	5,62 ± 0,05	4,07 ± 0,20	<0,001
MRSA	5,91 ± 0,14	4,30 ± 0,62	0,017
<i>S. epidermidis</i>	4,95 ± 0,07	3,54 ± 0,15	<0,001
<i>S. haemolyticus</i>	5,63 ± 0,09	1,88 ± 0,23	0,005
<i>S. hominis</i>	5,78 ± 1,21	4,00 ± 0,41	0,143
<i>S. capitis</i>	5,64 ± 0,23	2,79 ± 1,34	0,030

¹Angabe der Werte als Mittelwerte und Standardabweichung vom Mittelwert, jeweils für die Grundgesamtheit der untersuchten Stämme einer Bakterienspezies und ihres Phänotyps. Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS.

4.2.5 Herkunft der Bakterien

In den Methicillin-empfindlichen *S. aureus* (MSSA) zeigte sich insgesamt ein niedriger Anteil an IACS Stämmen. Bei den MRSA bestand ebenfalls ein geringer Anteil an ACS Stämmen, unabhängig von der Materialquelle. Allerdings ließen sich aus Urinproben keine IACS Stämme isolieren. Bei *S. epidermidis* bestand wie bei den übrigen CoNS zwar ein höherer Anteil an IACS, allerdings fällt auch bei diesen Arten auf, dass sich aus Urinkulturen nur Bakterienstämme vom ACS Phänotyp isolieren ließen. Außerdem zeigten sich hier die größten Häufigkeiten von IACS bei Isolaten aus Blutkulturen oder Wundabstrichen. *S. haemolyticus*, *S. hominis* und *S. capitis* fanden sich im Rahmen dieses Screenings nicht in Material

aus dem Respirationstrakt.

Tabelle 5 Anteil der Bakterien mit einem IACS Phänotyp bezogen auf die Bakterienquelle.
Angabe der Werte als Prozentualer Anteile der Grundgesamtheit.

Zeit	Anteil des IACS Phänotyps (%)			
	Blutkultur	Wunde	Respiration	Urin
<i>S. aureus</i>	1,36	1,46	2,78	0,00
MRSA	0,00	6,25	3,34	n.m.
<i>S. epidermidis</i>	23,21	22,38	25,00	0,00
<i>S. haemolyticus</i>	0,00	19,05	kein Material	0,00
<i>S. hominis</i>	75,00	100,00	kein Material	100,00
<i>S. capitis</i>	66,67	0,00	kein Material	0,00

4.3 Acetat Katabolismus

4.3.1 Acetat im Medium

Im Rahmen dieser Versuche wurde der Acetatgehalt im Medium bestimmt. Es sollte gezeigt werden, dass der verzeichnete Farbumschlag des Phenolrots, einhergehend mit einer pH Änderung des Mediums, tatsächlich mit einem unterschiedlichen Acetatgehalt in den beiden, mittels Screening bestimmten Varianten korrelierte. Hierzu wurden Stämme der ACS- und IACS-Varianten ausgewählt, die sich bei wiederholtem Wachstum für 15 Stunden als stabil erwiesen hatten. Der Acetatgehalt im Medium wurde hier in 3 verschiedenen Wachstumsphasen bestimmt, um den Verlauf des Katabolismus besser beurteilen zu können. Der erste Messzeitpunkt wurde nach 6 Stunden festgesetzt, da sich die Bakterien zu diesem Zeitpunkt am Ende der exponentiellen Wachstumsphase befanden, und die Verstoffwechselung von Glukose beendet ist, es aber noch nicht zu einem starken Verbrauch des im Medium befindlichen Acetats gekommen ist. Zu diesem Zeitpunkt ist bei den ACS-Varianten ein Maximum des Acetatgehalts im Medium zu erwarten. Die beiden späten Messzeitpunkte spiegeln die stationäre Wachstumsphase wieder, in der zu erwarten ist, dass das Bakterium Acetat als Kohlenstoffquelle verwendet und dieses somit aus dem Medium zurückgewinnt.

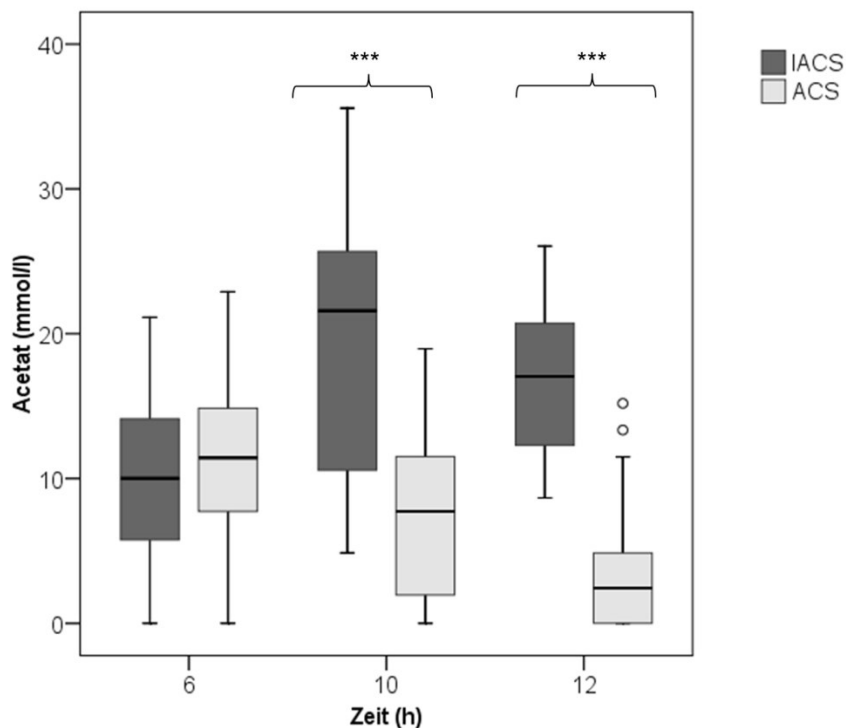


Abbildung 8: Acetatmenge im bakterienfreien Flüssigmedium. *Staphylococcus epidermidis*.

Verglichen wurden jeweils die IACS-(n=24) und ACS-(n=26) Phänotypen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (6,10 und 12 Stunden). Für jeden Stamm wurde zu jedem Zeitpunkt ein Messwert bestimmt. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 230 rpm und 37° C. Die Darstellung der Werte erfolgt als Boxplot. Dargestellt werden der Median (—), der Interquartilsabstand (25%-75%) (□), Wisker mit Werten innerhalb des 1,5 fachen Interquartilsabstand (\perp — \perp) und Ausreißer, größer als der 1,5 fache Interquartilsabstand (○). Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Test beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Die Abbildung 8 zeigt die Acetatmenge im bakterienfreien Medium der *S. epidermidis* Kulturen. Nach 6 Stunden Wachstum waren die Acetatmengen in beiden Phänotypen nahezu gleich, ein signifikanter Unterschied der OD war nicht vorhanden ($p=0,639$). Nach 10 Stunden Wachstum hingegen zeigte sich, dass in den ACS-Varianten eine große Menge an Acetat aus dem Medium verstoffwechselt wurde. Der Unterschied im Acetatgehalt des Mediums zwischen den beiden Phänotypen zu diesem Zeitpunkt war hoch signifikant ($p<0,001$). Zudem ist zu erkennen, dass die Acetatmenge im weiteren Wachstumsverlauf zwischen 10 und 12 Stunden weiter abnahm. Bei den IACS Phänotypen dagegen

zeigte sich zunächst noch ein weiterer Anstieg der Acetatmenge. Auch in den IACS Stämmen zeigte sich zwischen 10 und 12 Stunden ein leichter Abfall der sich im Medium befindenden Acetatmenge. Dennoch bestand auch nach 12 Stunden ein hoch signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied im Acetatgehalt der beiden Phänotypen.

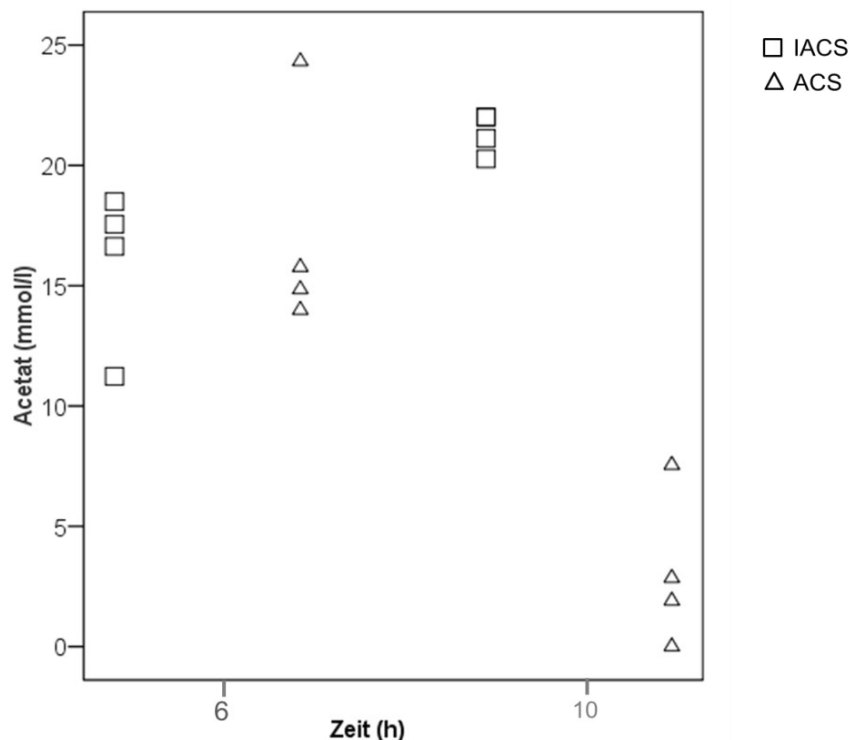


Abbildung 9 Acetatgehalt im Medium von *S. aureus* (inklusive MRSA). Darstellt sind jeweils die Acetatgehalte nach 6 und 10 Stunden Wachstum. Hierbei entspricht einem Bildpunkt dem in einer Probe pro Stamm gemessenen Wert. Abbildungsbedingt können nahe beieinander liegende Werte als ein Bildpunkt erscheinen. (Auf eine Boxplot Darstellung wurde aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs verzichtet).

Die Abbildung 9 zeigt die Acetatmenge im Bakterien-freien Medium von *S. aureus* Kulturen. Auch hier fanden sich nach 6 Stunden Wachstum ähnliche Acetatmengen. Zum Zeitpunkt $t=10$ Stunden zeigten sich bei allen Stämmen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Phänotypen. Auch die Streubreite der gemessenen Werte war, bei einer allerdings geringeren Stichprobe, nicht so ausgeprägt wie bei *S. epidermidis*.

4.3.2 Vergleich der Aconitase-Aktivität von IACSs und ACS

In diesem Versuchsaufbau sollte gezeigt werden, dass tatsächlich eine verminderte Aconitase-Aktivität und damit einhergehend ein verringerter TCA-Zyklus ursächlich für den erhöhten Acetatgehalt im Medium der IACSs ist. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden wiederum die Zeitpunkte 6 Stunden für die exponentielle Wachstumsphase und 10 Stunden für die frühe stationäre Phase gewählt. Die Aconitase-Aktivität zum Zeitpunkt 10 Stunden hatte dabei Auswirkungen auf den Acetatgehalt im Medium zu einem späteren Zeitpunkt (12 Stunden).

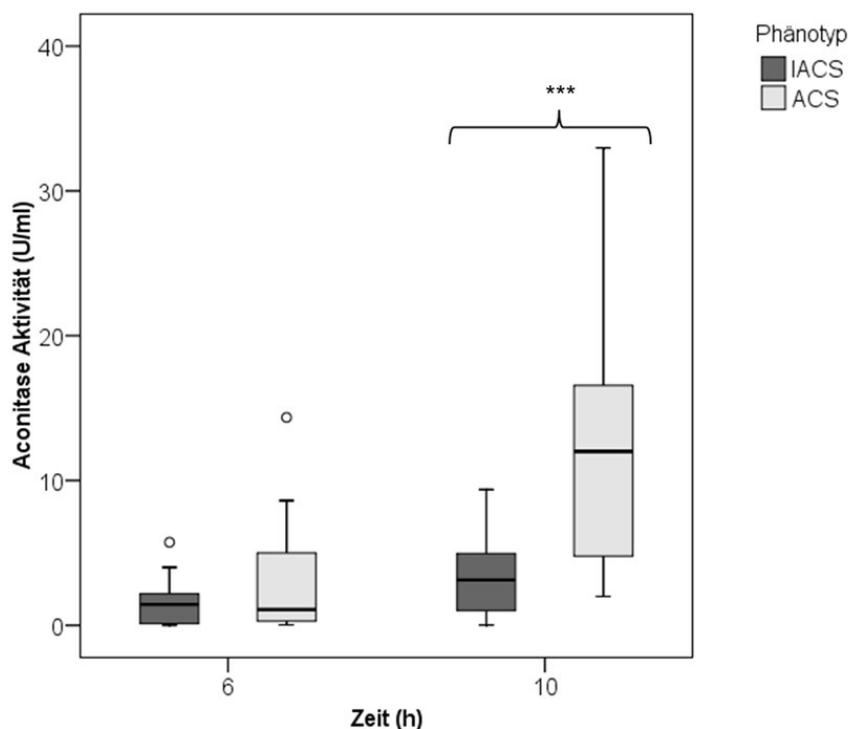


Abbildung 10: *Staphylococcus epidermidis* Aconitase Aktivität Verglichen wurden jeweils die IACS- (n=24) und ACS- (n=26) Phänotypen an zwei verschiedenen Zeitpunkten (6 und 10 Stunden). Für jeden Stamm wurde zu jedem Zeitpunkt ein Messwert bestimmt. Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 230 rpm und 37° C. Die Darstellung der Werte erfolgte als Boxplot. (Die Symbole entsprechen Abb. 7). Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) an verschiedenen Zeitpunkten bei den jeweiligen Phänotypen von *S. epidermidis*.

Im Vergleich der Aconitase-Aktivitäten der beiden Phänotypen zeigte sich nach 6 Stunden Wachstum zwar eine etwas höhere Aktivität bei den ACS-Varianten, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Bei beiden Varianten waren zum späteren Messzeitpunkt höhere Enzymaktivitäten zu beobachten, wobei die Aconitase-Aktivitäten zum Zeitpunkt 10 Stunden in den ACSs im Gegensatz zu den IACSS deutlicher zunahm. So zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein hoch signifikanter Unterschied in den Enzymaktivitäten der beiden Phänotypen ($p < 0,001$). Dennoch war auch hier eine große Streubreite in den einzelnen Messungen vorhanden.

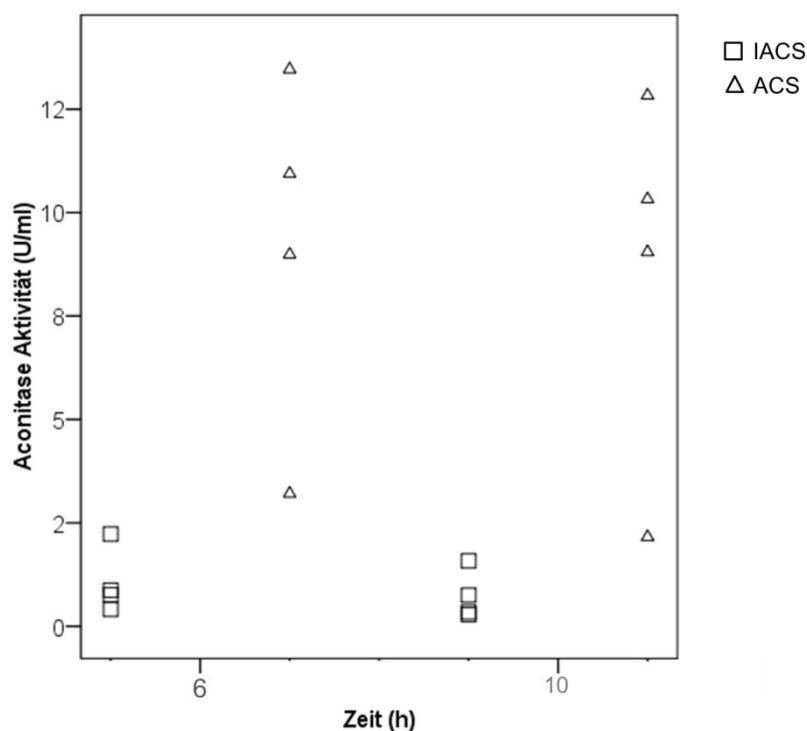


Abbildung 11: *Staphylococcus aureus* Aconitase-Aktivität (inkl. MSRA) zu verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt ist jeweils die Aconitase Aktivität nach 6 und 10 Stunden Wachstum. Hierbei entspricht ein Bildpunkt dem, in einer Probe pro Stamm gemessenen Wert. Abbildungsbedingt können nahe beieinander liegende Werte als ein Bildpunkt erscheinen.

Analog zum stärkeren Wachstum bei *S. aureus* im Gegensatz zu *S. epidermidis* zeigten sich bereits nach 6 Stunden hohe Aconitase-Aktivitäten in den ACS-Varianten, die auch zum späten Messzeitpunkt ähnlich hoch zu verzeichnen waren. Die Aconitase-Aktivitäten in den IACSS blieb sowohl nach 6 Stunden als auch nach 10 Stunden in allen Stämmen niedriger als in der ACS Gruppe.

4.3.3 Korrelation zwischen dem Acetatgehalt und der Aconitase-Aktivität

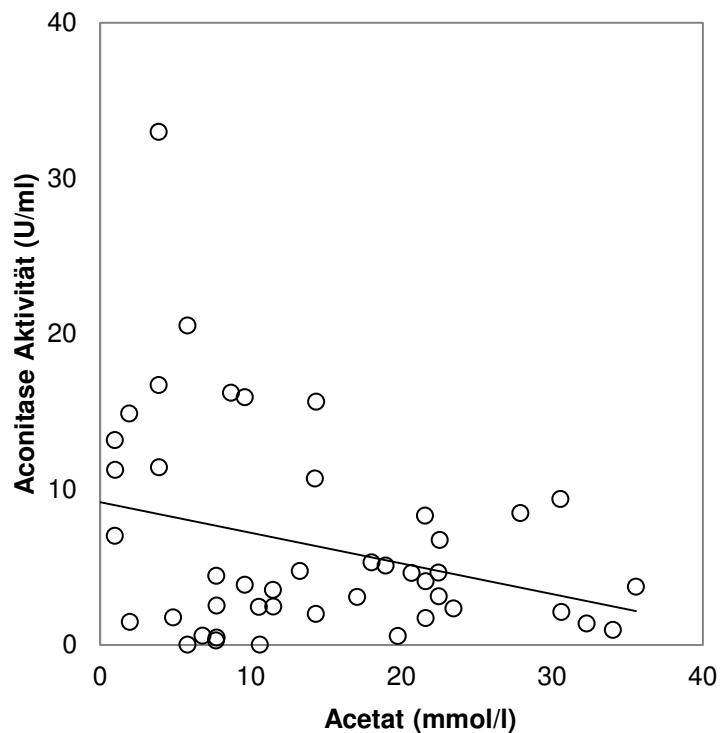


Abbildung 12: Korrelation zwischen der Aconitase-Aktivität und der Acetatmenge bei *S. epidermidis*. Gezeigt werden hier die nach 10 Stunden gemessenen Werte. Ein Bildpunkt entspricht dabei einem pro Stamm gemessenen Wert (n=48)

Vergleicht man die Acetatgehalte der Isolate in der frühen stationären Wachstumsphase (Messzeitpunkt 10h) mit den entsprechenden Aconitase-Aktivitäten, so erhält man eine Korrelation nach Pearson von -0,314, entsprechend Signifikanz von $p=0,030$. Damit liegt eine Korrelation zwischen dem Acetatgehalt und der Aconitase-Aktivität vor. Ein hoher Acetatgehalt im Medium korreliert dabei mit einer eher niedrigen Aconitase-Aktivität.

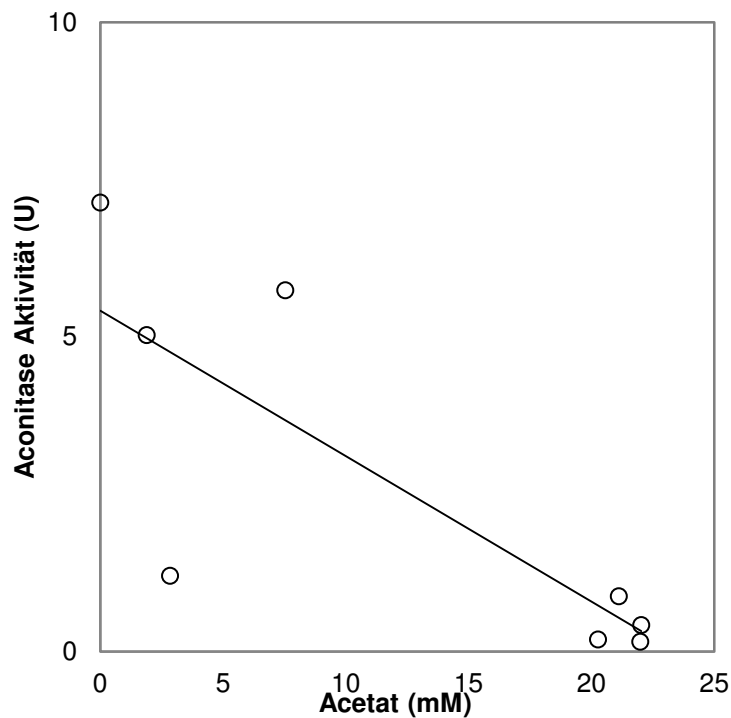
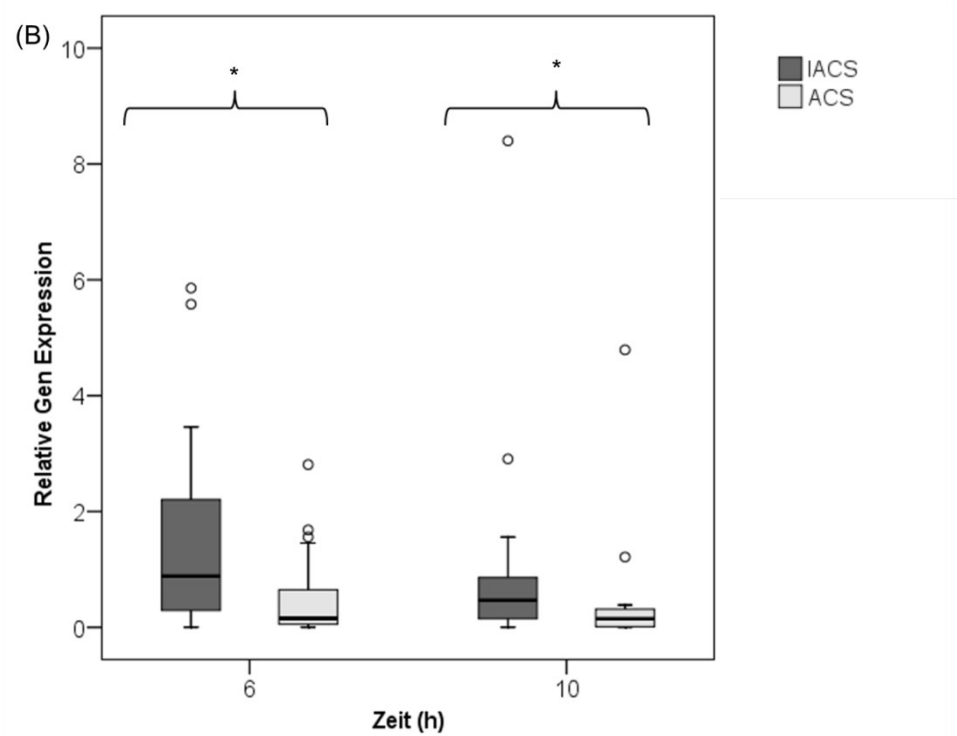
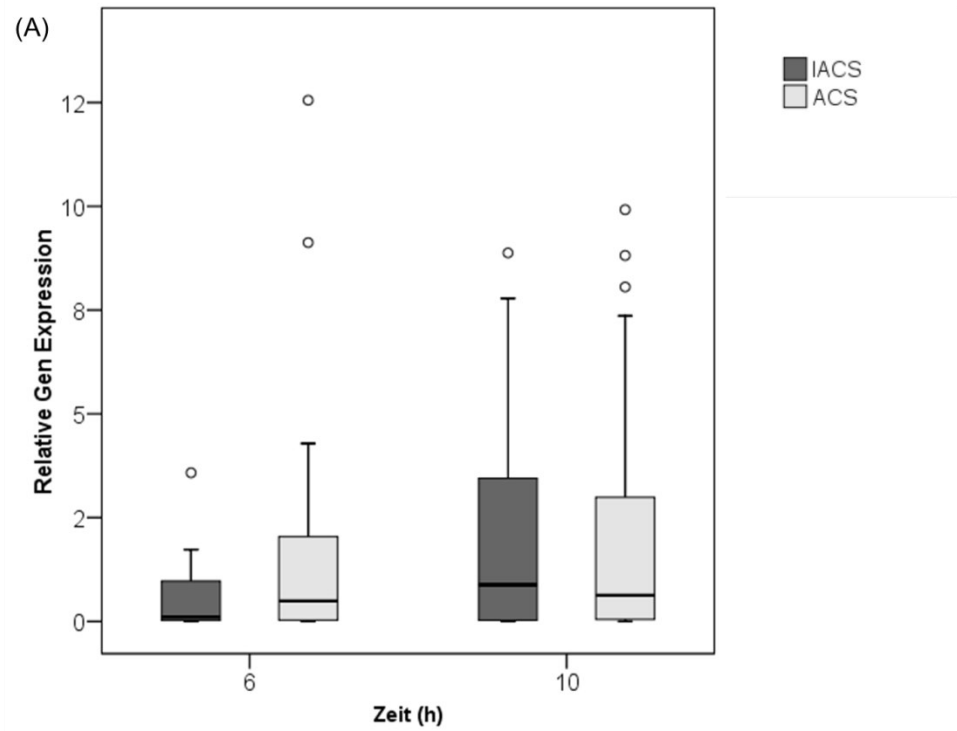


Abbildung 13 Korrelation zwischen der Aconitase Aktivität und der Acetatmenge bei *S. aureus*. Gezeigt werden hier die nach 10 Stunden gemessenen Werte. Ein Bildpunkt entspricht dabei einem pro Stamm gemessenen Wert (n=8)

Auch beim Vergleich der Aconitase-Aktivitäten mit dem Acetatgehalt im Medium in der stationären Phase in den *S. aureus* Stämmen erhält man, trotz des geringen Stichprobenumfangs von n=8, eine Korrelation nach Pearson von -0,805, entsprechend einer Signifikanz von 0,016.

4.4 Gen-Expression (Versuchsdurchführung siehe 3.2.6)

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen für *S. epidermidis* dargestellt.



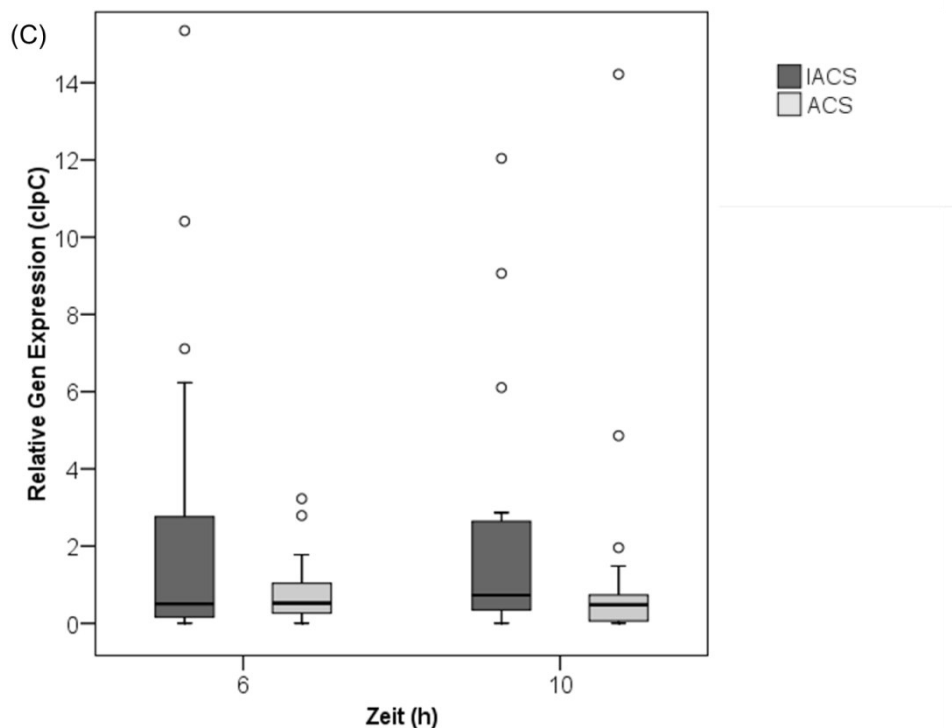
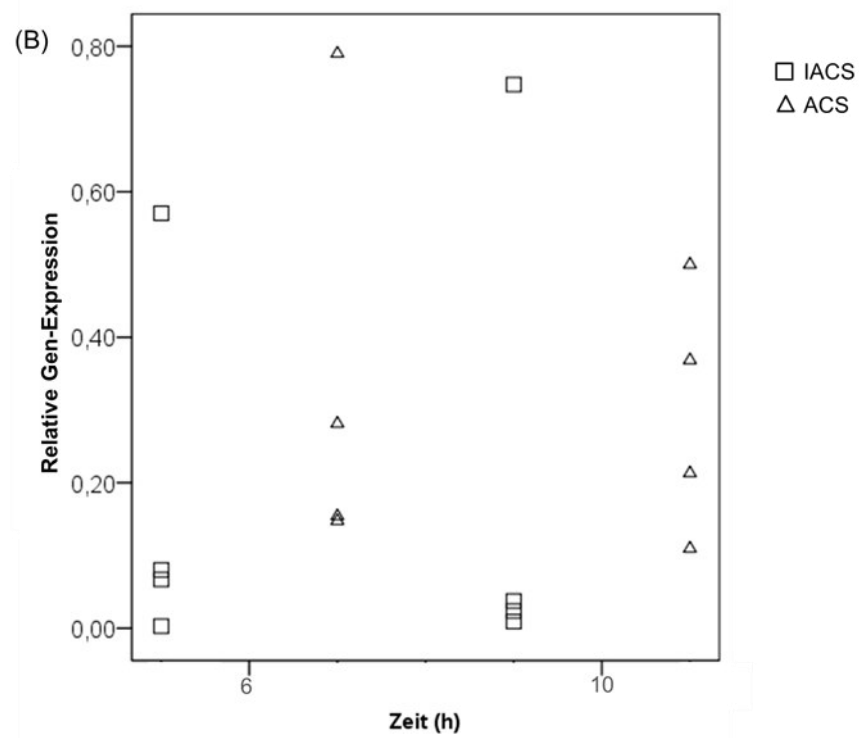
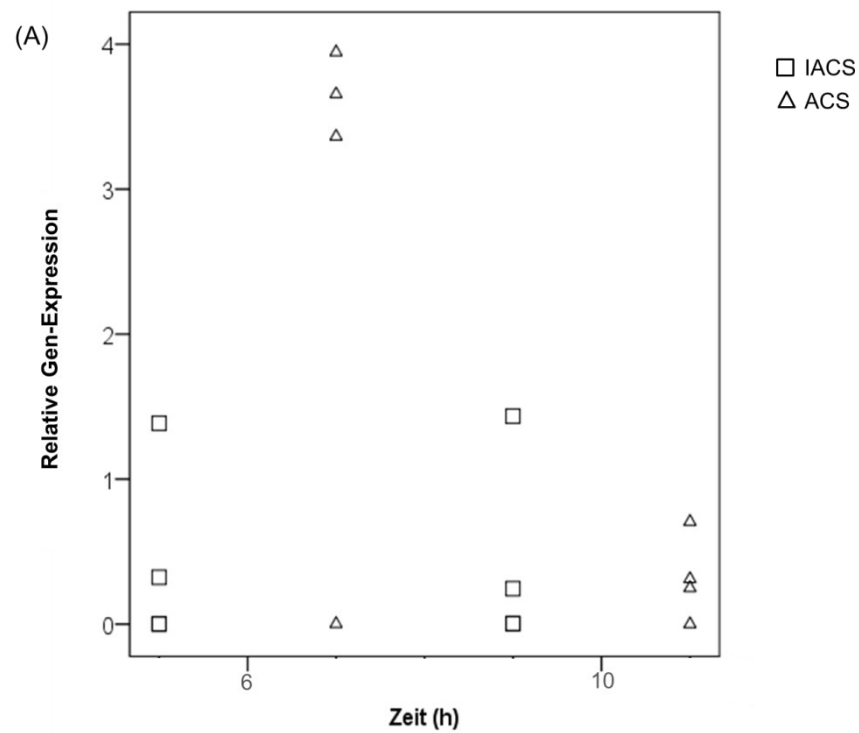


Abbildung 14: Relative Gen-Expression bei *S. epidermidis*. Verglichen wurden jeweils die IACS- (n=24) und ACS- (n=26) Phänotypen. Nach 6 und 10 Stunden wurde pro Stamm eine Probe für die RNA Isolation entnommen. Es wurde die relative Gen Expression von *citB* (A), *ascA* (B) und *clpC* (C) bestimmt. Die Darstellung der Werte erfolgt als Boxplot. (Symbole siehe Abb. 7). Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) zu verschiedenen Zeitpunkten bei den jeweiligen Phänotypen von *S. epidermidis*.

Bei der Transkription des für die Aconitase kodierenden *citB* Gens zeigte sich zum frühen Messzeitpunkt eine tendenziell höhere Expression in den ACSs. Diese war jedoch nicht signifikant ($p=0,208$). Zum späteren Messzeitpunkt (10 Stunden) fand sich nahezu kein messbarer Unterschied mehr in der Transkription von *citB* ($p=0,944$). Bei der Transkription von *acsA* (kodiert für die Acetyl-CoA Synthetase) zeigte sich hingegen an beiden Zeitpunkten eine höhere Expression in den IACSs, die sowohl in der 6 Stunden Kultur ($p=0,037$) als auch nach 10 Stunden ($p=0,04$) signifikant war. Die *clpC*-Transkription war nach 6 Stunden Wachstum bei den IACS Varianten höher als bei den ACS, zeigte allerdings eine sehr große Streubreite und war nicht signifikant ($p=0,909$). Dies war nach 10 Stunden Wachstum sogar noch etwas deutlicher.

Die folgenden Graphiken stellen die relative Gen Expression bei *S. aureus* dar.



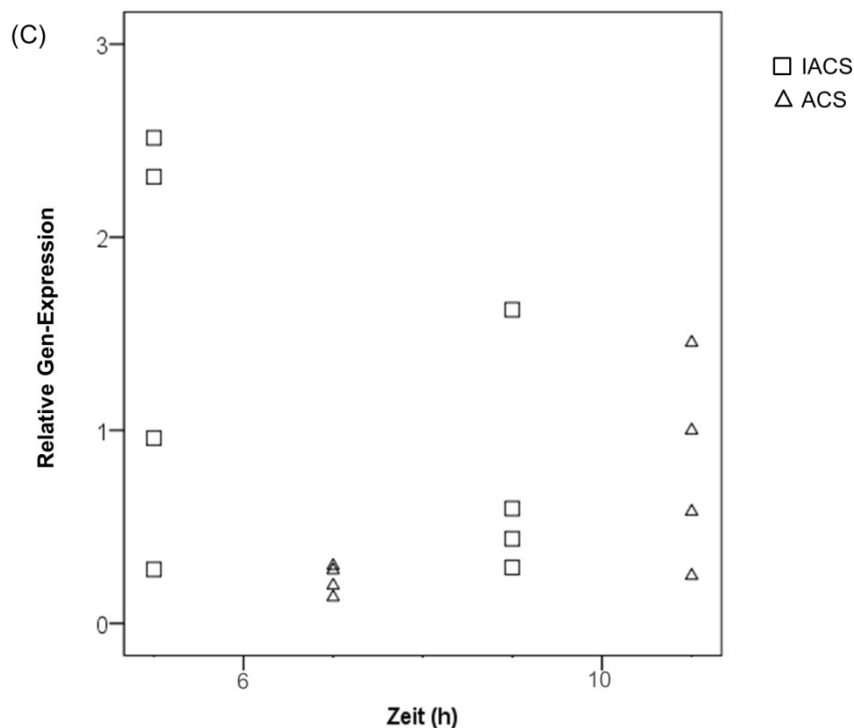


Abbildung 15 Relative Gen Expression in *S. aureus*. Dargestellt ist jeweils die relative Gen Expression nach 6 und 10 Stunden Wachstum. Hierbei entspricht einem Punkt dem, in einer Probe pro Stamm gemessenen Wert. Abbildungsbedingt können nahe beieinander liegende Werte als ein Bildpunkt erscheinen.

In *S. aureus* ist die *citB*-Transkription während der exponentiellen Wachstumsphase in der ACS-Gruppe höher als bei den IACSs ($p=0,081$). Nach 10 Stunden Wachstum näherten sich die Werte dagegen an. Bei der *acsA* Transkription wurde zu beiden Messzeitpunkten kein deutlicher Unterschied festgestellt. Die Transkription von *clpC* wiederum war nach 6 Stunden Wachstum in der IACS-Gruppe gegenüber der ACS-Gruppe erhöht. Nach 10 Stunden Wachstum war die Genexpression hier geringer als zum frühen Messzeitpunkt.

4.5 Vitalitätsanalysen

4.5.1 Vergleich des Bakterienwachstums (Versuchsdurchführung siehe 3.2.3)

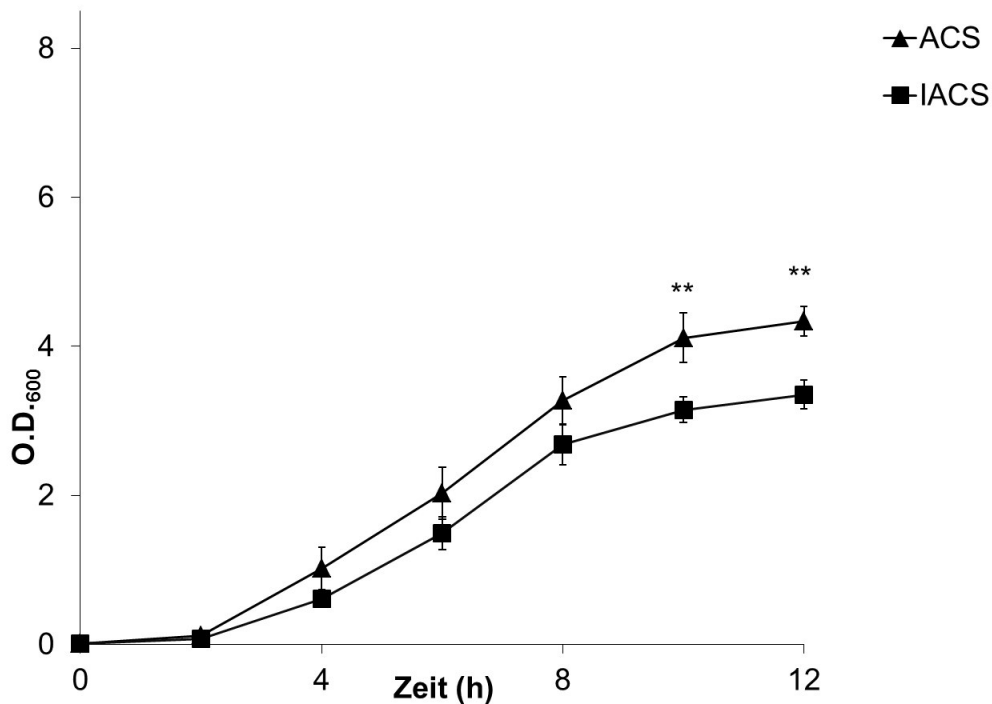


Abbildung 16: Wachstumskurve *S. epidermidis*. Darstellung der Werte als Mittelwert und Standardfehler. (○). Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) zu verschiedenen Zeitpunkten bei den jeweiligen Phänotypen von *S. epidermidis*.

Bei den Versuchen zeigte sich in der frühen Wachstumsphase bis zu 8 Stunden, also in etwa der Zeit, in der Glukose verstoffwechselt wird, ein leicht stärkeres Wachstum in den ACS. In der späteren Wachstumsphase zeigte sich sogar ein signifikanter Unterschied in der Bakteriendichte (10 Stunden ($p=0,009$) 12 Stunden ($p=0,002$))

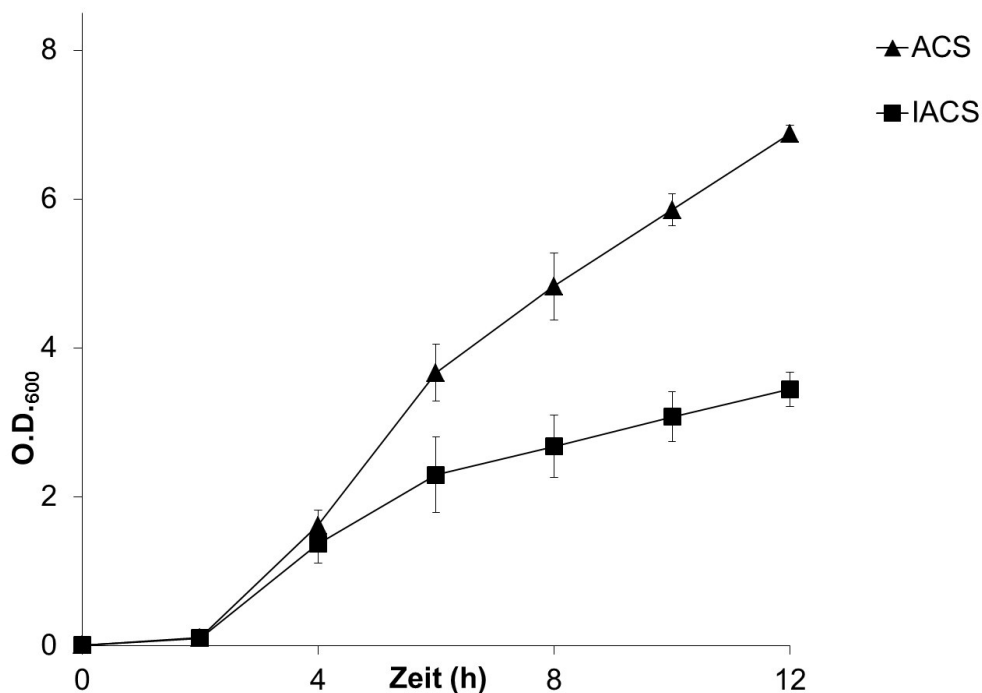


Abbildung 17: Wachstumskurve *S. aureus*. Darstellung der Werte als Mittelwert und jeweiliger Standardfehler. Verglichen wurden IACS (n=4) und ACS (n=4).

Auch bei *S. aureus* bestand in der frühen Wachstumsphase kein deutlicher Wachstumsunterschied zwischen den beiden Gruppen. Nach 8 Stunden fand sich jedoch ein höheres Wachstum im ACS-Phänotyp. Nach 10 und 12 Stunden wurde dieser Wachstumsunterschied noch deutlicher.

4.5.2 CFU Determination und Anteil lebender/toter Zellen

Zur Überlebensanalyse wurde zunächst die Menge der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU), also der Bakterien einer Kultur, die zur Vermehrung fähig sind, bestimmt. Dies erfolgte nach 6 (exponentielle Wachstumsphase), 10 (stationäre Phase) und nach 30 Stunden (spätstationäre Wachstumsphase).

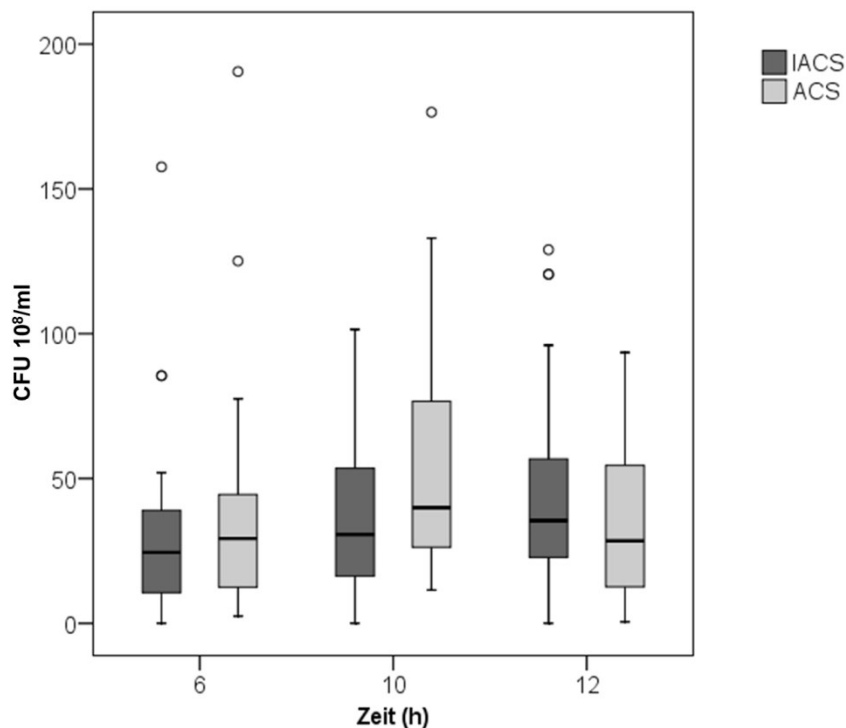


Abbildung 18: CFU/ml in *S. epidermidis*. Die Darstellung der Werte erfolgt als Boxplot. Dargestellt werden der Median (—), der Interquartilsabstand (25%-75%) (□), Wisker mit Werten innerhalb des 1,5 fachen Interquartilsabstand (⊥) und Ausreißer, größer als der 1,5 fache Interquartilsabstand (○). Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) zu verschiedenen Zeitpunkten bei den jeweiligen Phänotypen von *S. epidermidis*.

Nach 6 Stunden Wachstum zeigte sich in den beiden Phänotypen kein statistisch erfassbarer Unterschied in der Anzahl vermehrungsfähiger Bakterien ($p=0,386$). Nach 10 Stunden Wachstum bestand ein größerer Unterschied im Sinne eines höheren CFU-Wertes in der ACS Gruppe ($p=0,095$). In der spätstationären Wachstumsphase (nach 30 Stunden) zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied mehr ($p=0,702$). Allerdings war trotz des geringen Unterschiedes zu den einzelnen Zeitpunkten festzustellen, dass bei den ACS Stämmen eher die Tendenz zu einem Abfall der CFU im späteren Zeitverlauf bestand, während die IACS Stämme hier eine größere Stabilität aufwiesen. Im Vergleich der CFU Werte nach 10 Stunden und 30 Stunden zeigte sich ein Abfall der Werte zum späteren Zeitpunkt, der allerdings nicht signifikant war ($p=0,060$).

In der IACS Gruppe war kein Unterschied erruierbar ($p=0,410$)

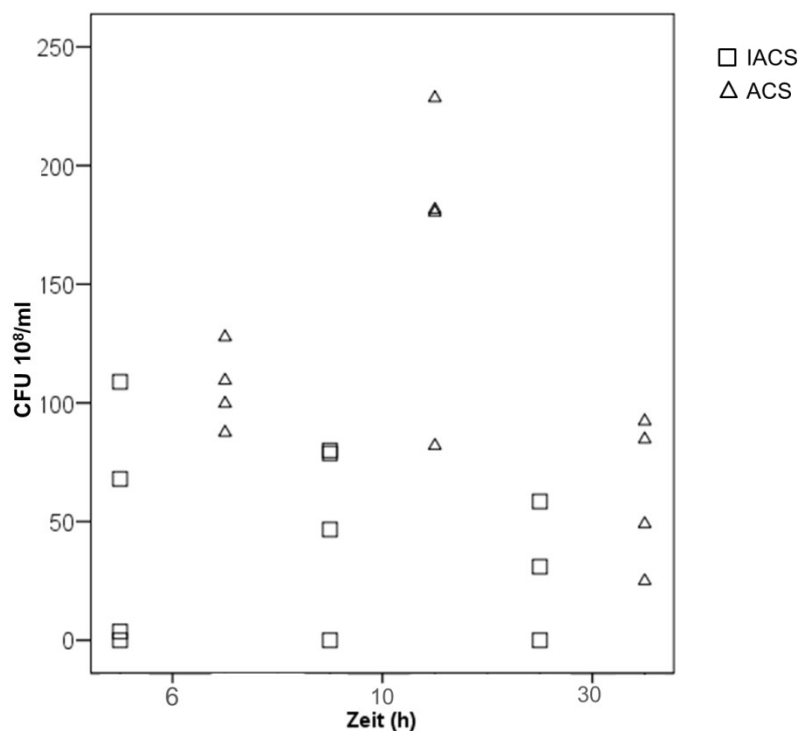


Abbildung 19: CFU/ml in *S. aureus*. Darstellt ist jeweils die CFU nach 6, 10 und 30 Stunden Wachstum. Hierbei entspricht einem Punkt dem, in einer Probe pro Stamm gemessenen Wert. Abbildungsbedingt können nah beieinander liegende Werte als ein Bildpunkt erscheinen.

Auch in *S. aureus* zeigte sich nach 6 Stunden Wachstum eine leicht höhere Anzahl an Kolonie-bildenden Einheiten. Nach 10 Stunden Wachstum kam es hier in den ACS-Phänotypen zu einem ausgeprägteren Anstieg der CFU im Vergleich zu den IACS-Phänotypen in *S. epidermidis*. Zu diesem Zeitpunkt bestand nun auch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Phänotypen. In *S. aureus* zeigte sich nach 30 Stunden Wachstum bei den ACS-Stämmen wiederum ein signifikanter Abfall in den CFU gegenüber dem Wert, der nach 10 Stunden Wachstum vorlag ($p=0,033$). Dieser Abfall war in den IACS Stämmen weniger deutlich ausgeprägt.

4.5.3 Anteil lebender Zellen nach 30 Stunden Wachstum

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte das tatsächliche Verhältnis lebender zu toten Zellen ermittelt werden. Hierzu wurden die Bakterien erneut für 30 Stunden wachsen gelassen. Anschließend erfolgte eine „live-death-staining“. Aufgrund der geringen Anzahl an *S. aureus* und einer demzufolge niedrigen Aussagekraft wurden hier nur die *S. epidermidis* Stämme untersucht.

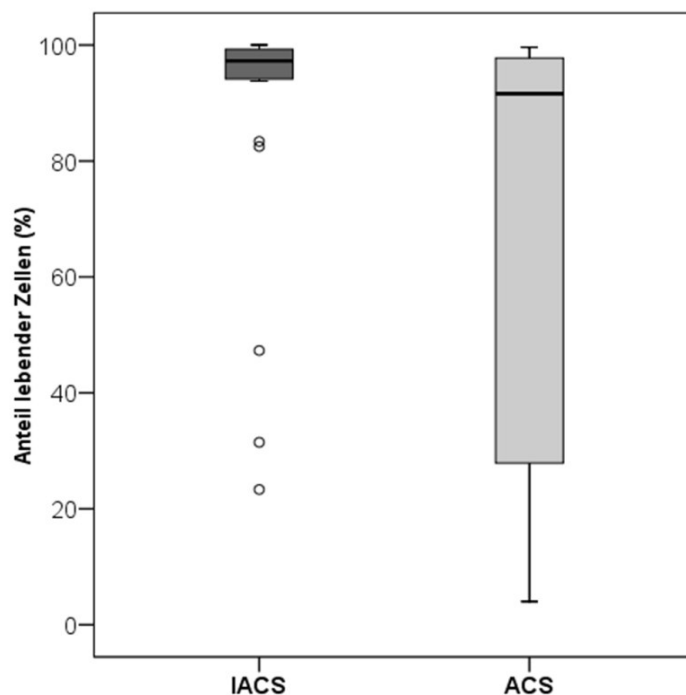


Abbildung 20: Anteil lebender Zellen nach 30 Stunden Wachstum in *S. epidermidis*. ACS n=24 und IACS n=24). Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) zu verschiedenen Zeitpunkten bei den jeweiligen Phänotypen von *S. epidermidis*.

In der IACS-Gruppe zeigte sich im Mittel ein Anteil von 88,3% an lebenden Bakterien. Bei der ACS-Gruppe dagegen belief sich der mittlere Anteil der lebenden Bakterien auf 66,87%. Damit ergab sich nach 30 Stunden Wachstum ein signifikant höheres Überleben in der IACS Gruppe ($p=0,014$)

4.5.4 Vergleichende Vitalitätsanalysen in der stationären Phase

Im Rahmen dieser Versuche sollte untersucht werden, ob die Stämme mit einem IACS-Phänotyp in den späteren Wachstumsphasen im Gegensatz zu den ACS-Stämmen eine erhöhte Anzahl an vitalen Zellen besaßen. Hierzu wurden bei *S. aureus* und *S. epidermidis* jeweils ein Stamm mit hoher Stabilität ausgewählt.

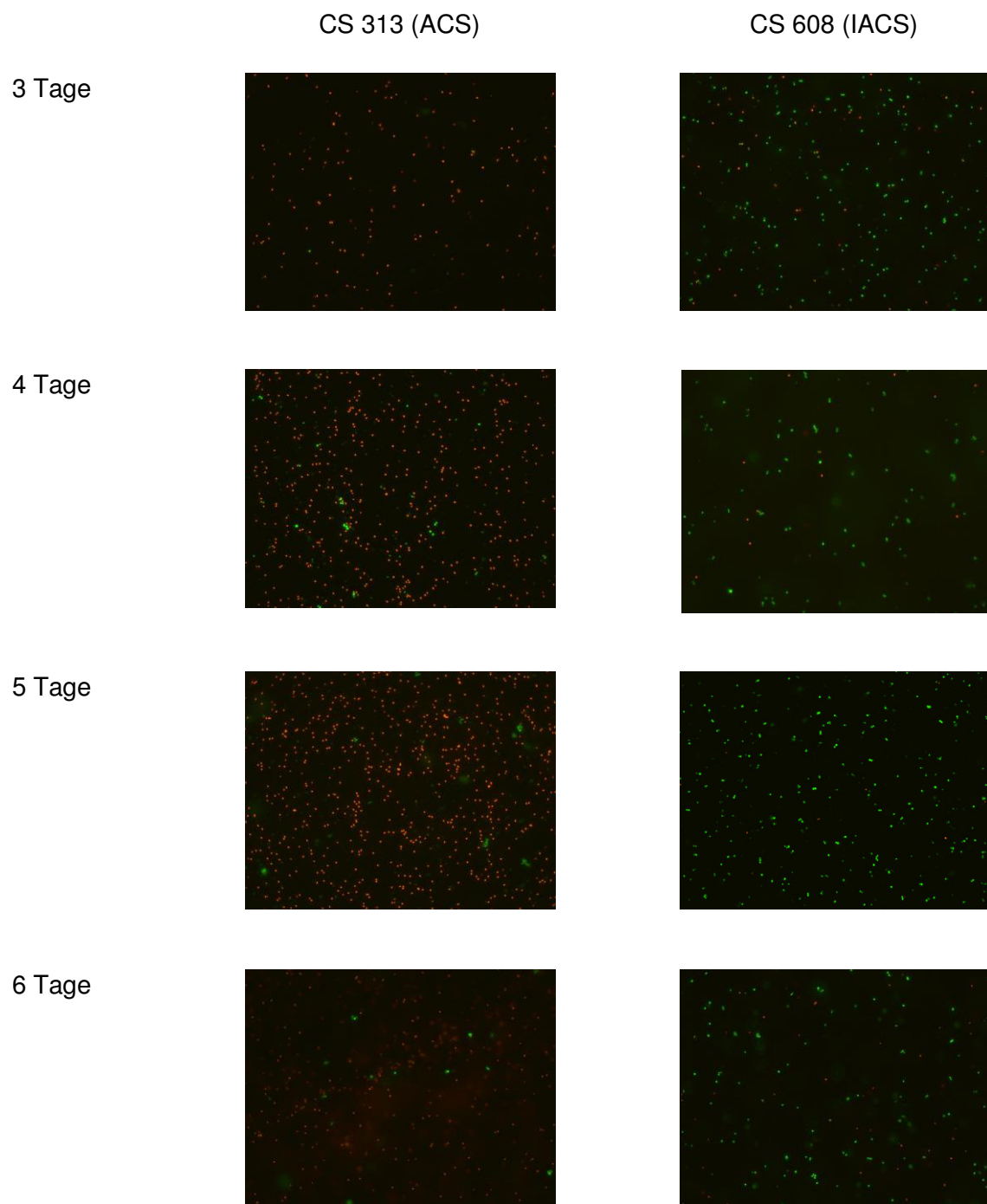


Abbildung 21 Life-Death Stain in *S. aureus*

Die Abbildung zeigte Overlay- Aufnahmen eines Fluoreszenzmikroskops. Lebende Zellen zeigen sich grün angefärbt. Tote Zellen sind rot dargestellt.

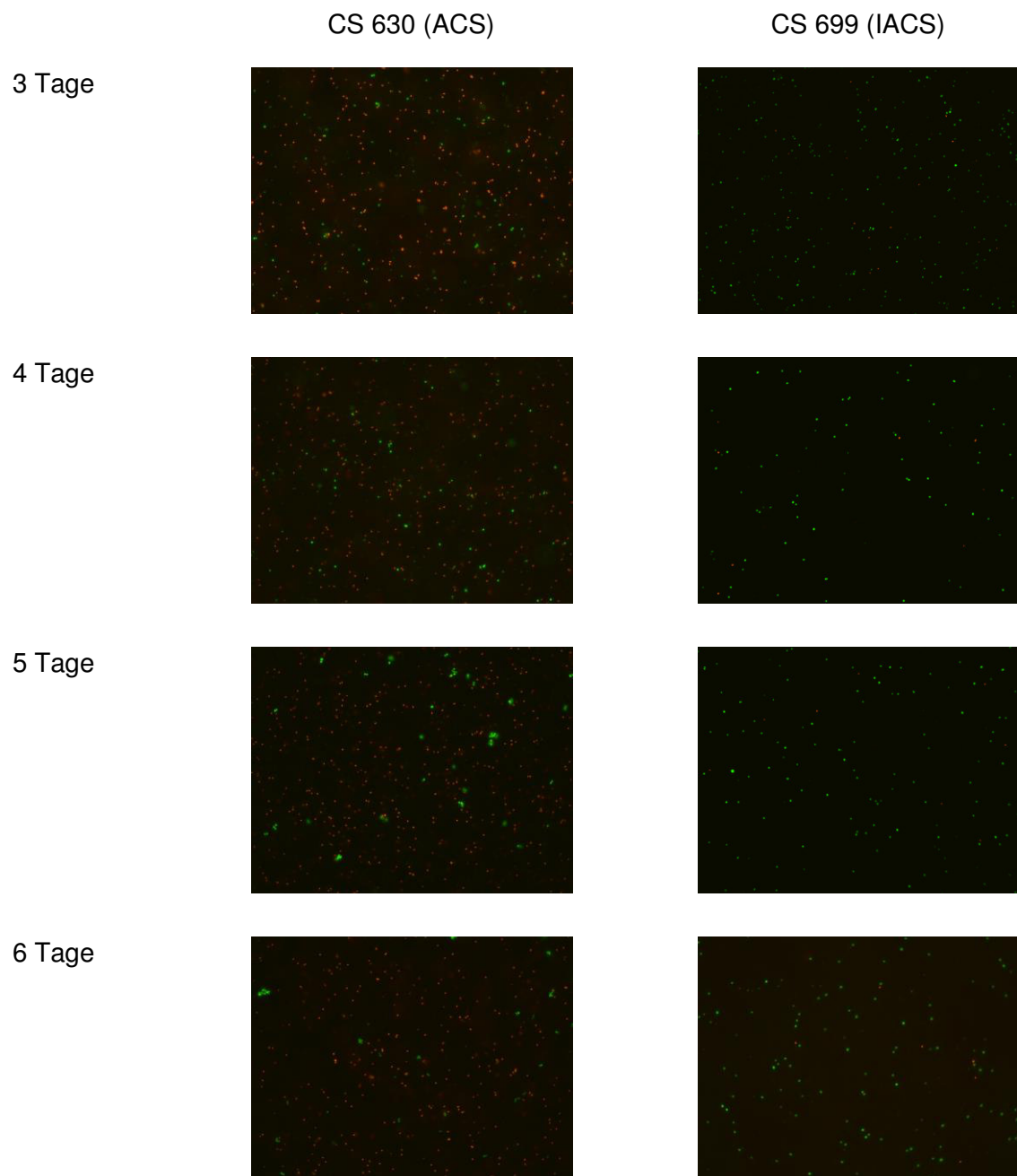


Abbildung 22: Life-Death Stain in *S. aureus*

¹Die Abbildung zeigte Overlay- Aufnahmen eines Fluoreszenzmikroskops. Lebende Zellen zeigen sich grün angefärbt. Tote Zellen sind rot dargestellt.

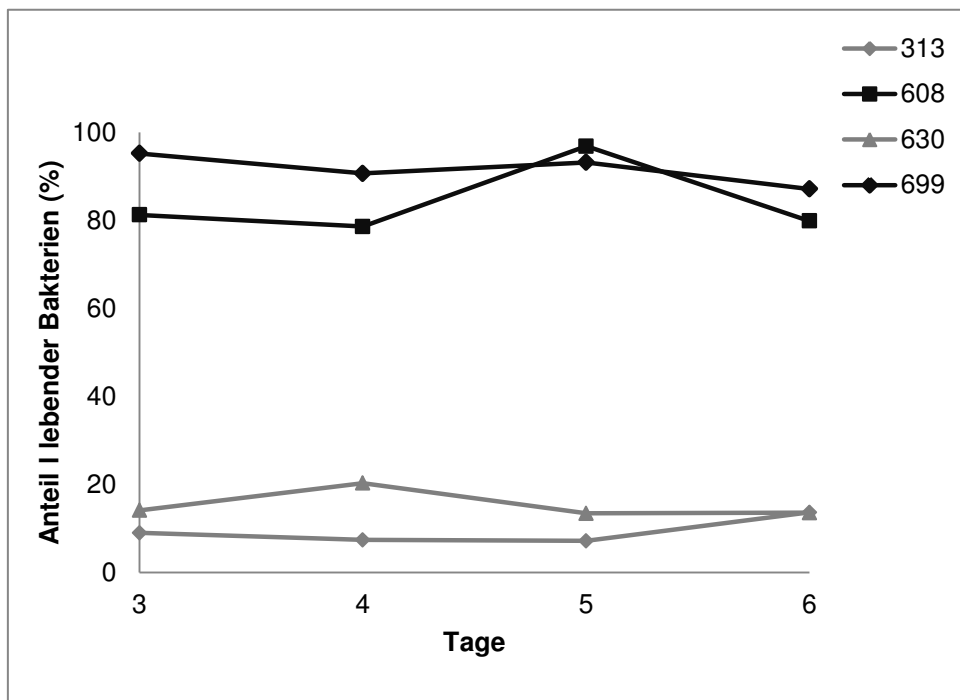


Abbildung 23: Anteil der lebenden Bakterien eines Stammes in der spätstationären Wachstumsphase (Zeitpunkt der Beobachtung 3-6 Tage) *S. epidermidis*: CS 630 (ACS), CS 699 (IACS), *S. aureus*: CS 313 (ACS), CS 608 (IACS)

In dieser Versuchsreihe zeigten sich bei der IACS-Gruppe sowohl in *S. aureus* als auch in *S. epidermidis* durchgängig bedeutend höhere Anteile an lebenden Bakterien als in der ACS Gruppe. Bei CS 699 betrug der Anteil vitaler Zellen sogar durchgängig bis zum Ende der Messung mehr als 90%. Auch CS 608 zeigte bis zum 6. Wachstumstag einen hohen Anteil lebender Zellen. Analog zu dem hohen Anteil bei den beiden ausgewählten Stämmen der IACS Gruppe lagen bei CS 313 und bei CS 630 ein sehr niedriger Anteil an lebenden Zellen vor. In CS 630 nahm der Anteil nach 4 Tagen sogar noch weiter leicht ab. Bei CS 313 war die Menge der lebenden Zellen dagegen konstant bis leicht ansteigend.

4.6 Vancomycin Resistenz

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden mittels eines E-Tests die MIC der einzelnen Bakterienstämme untersucht, um herauszuarbeiten, ob hier Unterschiede zwischen den IACS und den ACS Phänotypen bestanden.

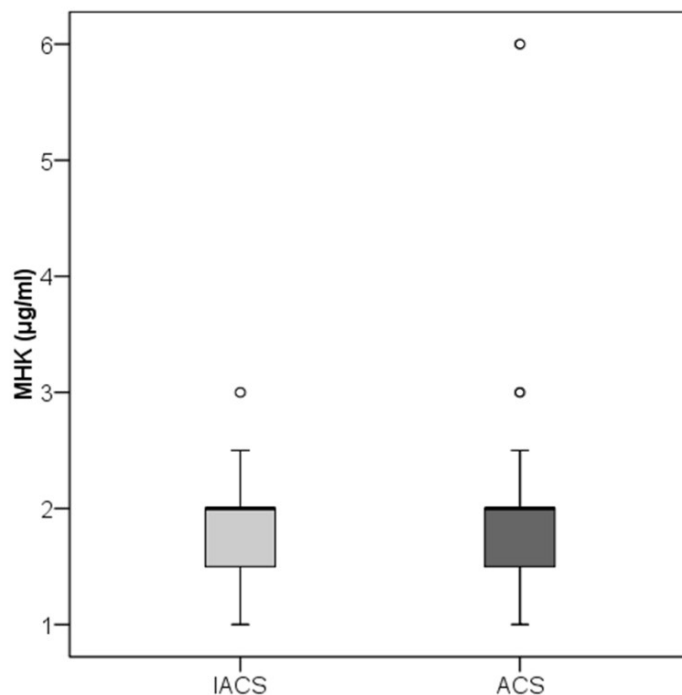


Abbildung 24: Vergleich der mittleren MIC-Werte für Vancomycin Die Berechnung der p-Werte (zweiseitig) erfolgte mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests beruhend auf dem Vergleich von ACS vs. IACS. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) zu verschiedenen Zeitpunkten bei den jeweiligen Phänotypen von *S. epidermidis*

Bei *S. epidermidis* zeigte sich zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der MIC für Vancomycin. Interessanterweise lagen generell höhere MIC in allen getesteten Stämmen vor. Die Werte rangierten im Bereich zwischen einer MIC von 1 µg/ml und 2,5 µg/ml. In der *S. aureus* Population besaß ein Stamm eine MIC von 6 µl und wurde somit als VISA klassifiziert.

5 Diskussion

5.1 Unterschiede zwischen den verschiedenen Staphylokokkenarten

Grundlage für die vorliegende Arbeit war die Veröffentlichung von Nelson *et al.* [58], die sich mit einem vermindertem Acetatkatabolismus bei VISA und VRSA Stämmen beschäftigten. Bei den dort verwendeten Bakterien handelte es sich allerdings um Laborstämme, bei denen sich innerhalb der VISA/VRSA Gruppe ein signifikant höherer Anteil an Bakterien mit einem verminderten Acetatkatabolismus zeigte. Die Autoren beobachteten in dieser Studie, dass ebenfalls der Übergang von einer Niedrig-Resistenz zu einer Hoch-Resistenz mit einer Verminderung im Acetatstoffwechsel einherging. Hierbei wurden je 2 VISA Stämme und zwei VRSA Stämme miteinander verglichen, also eine sehr geringe Anzahl, sodass keine gültige Aussage zur Signifikanz getroffen werden kann [58]: Daher entschieden wir uns dazu ein Screening an klinischen Staphylokokken Stämmen durchzuführen um zu eruieren ob es auch bei klinischen *S. aureus* Stämmen und anderen Staphylokokken einen eingeschränkten Zitratzyklus gibt, wie hoch der Anteil an der Grundgesamtheit ist und ob er in Zusammenhang mit einer verminderten Vancomycinempfindlichkeit steht. Analog zu den Ergebnissen von Nelson und Kollegen lag beim Screening in unserem klinischen Hintergrund nur bei einem geringen Anteil der *S. aureus*-Population (MSSA und MRSA) ein eingeschränkter Acetatstoffwechsel vor. In denen von Nelson und Kollegen durchgeführten Versuchen mit Laborstämmen fand sich in 8% der VSSA Stämme ein eingeschränkter Acetatkatabolismus, in unserem Screening lag die Menge mit 1 % bei den MSSA noch deutlich tiefer, in den MRSA haben wir mit einer Häufigkeit von 13% dagegen sogar einen höheren Anteil an IACS gefunden. Leider wurde in der Arbeit von Nelson und Kollegen nicht angegeben ob es sich bei den VSSA um MRSA oder MSSA handelte, weswegen hier eine genauer Vergleich mit unseren Ergebnissen nicht möglich ist. Die Gesamtzahl von untersuchten Stämmen ist in unser Arbeit zudem höher als bei Nelson und Kollegen, wo lediglich 7 VISA

Stämme mit 25 VSSA Stämmen verglichen wurden [58]. Interessanterweise fanden wir bei den Koagulase-negativen Bakterien jedoch generell einen deutlich höheren Anteil an IACSs, als in der *S. aureus* Population. In den von uns untersuchten Stämmen fand sich nur ein Stamm, der als VISA klassifiziert werden konnte und kein VRSA. Auch wenn wir daher keine Aussage zwischen einer eingeschränkten Vancomycinempfindlichkeit treffen konnten, so decken sich diese Daten doch größtenteils damit, dass weder VISA noch VRSA Stämme bisher in Europa endemisch sind [37]. Allerdings wurden durchgehend MHK-Werte von mehr als 1 µg/ml ermittelt. Bei einzelnen Stämmen wuchsen einzelne Tochterkolonien auch bei einer Antibiotikakonzentrationen von ≥ 3 µg/. Ein einzelner *S. epidermidis* Stamm der ACS Gruppe konnte aufgrund seiner MHK von 6 µg/ml als VISA eingestuft werden. Dies zeigt, dass zukünftig auch in unserem klinischen Umfeld das Problem von Vancomycinresistenzen auftreten kann. Aufgrund der besonderen klinischen Bedeutung von *S. aureus* und *S. epidermidis* haben wir uns dazu entschieden, diese beiden Staphylokokkenarten näher zu untersuchen.

5.2 Anwendbarkeit von Phenolrot als Indikator für das Screening auf einen verminderten Acetatkatabolismus.

Auch wenn sich vorhergehende Veröffentlichungen bereits mit der möglichen klinischen Bedeutung von Staphylokokken mit einem eingeschränkten Zitratzyklus befasst haben, wobei hier insbesondere das verlängerte Langzeitüberleben von Laborstämmen [85] und die erhöhte Resistenz gegenüber β -Laktam Antibiotika [11] von Bedeutung ist, so wurde bislang noch keine Methode vorgeschlagen, diese Stämme im klinischen Alltag detektieren zu können, sodass wir im Rahmen unserer Arbeit feststellen wollten ob sich ein Screening mittels Farbindikator eignet. Phenolrot unterliegt als pH-Indikator bereits vielfältigen Anwendungen in der Routinediagnostik. Beim Wachstum in Medien mit Glukose oder anderen schnell verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen gilt ein saurer pH-Wert als

Indikator für die Acetatproduktion während des normalen aeroben Wachstums von *S. aureus* [22, 25, 87]. Aufgrund der Veränderungen im Wachstumsverlauf kann man den pH-Wert und somit auch Phenolrot als Indikator für die jeweilige Wachstumsphase und auch für die als Screening Methode für die Aktivität des TCA-Zyklus nutzen [25]. Hierbei ist es von großer Bedeutung, dass ausreichend aerobe Bedingungen vorliegen, um sicherzustellen, dass der zu messende saure pH-Wert auf Acetat zurückzuführen ist, und nicht auf das bei anaeroben Verhältnissen möglicherweise produzierte Laktat. Unter streng aeroben Bedingungen konnten wir durchgehend eine Korrelation der Farbe und somit des pH-Wertes des Mediums mit einem hohen oder niedrigen Acetatgehalt gezeigt werden, womit auch die Aconitase Aktivität umgekehrt proportional korrelierte. Generell ergibt sich allerdings das Problem, dass Bakterienstämme, die allgemein ein langsames Wachstumsmuster besitzen (z.B. bedingt durch die große Variabilität innerhalb der *S. epidermidis* Population), fälschlicherweise als IACS-Stämme identifiziert werden können. Um diese Anzahl möglichst gering zu halten, wurde daher in unseren Screening Untersuchungen eine Wachstumszeit von 15 Stunden gewählt, auch wenn bei den meisten Stämmen schon nach 10-12 Stunden eine Zuordnung möglich war, wie die quantitative Bestimmung des Acetatgehaltes im Medium zeigte, die bei *S. aureus* bei 10 Stunden und bei *S. epidermidis* aufgrund des generell langsameren Wachstums nach 10 und 12 Stunden vorgenommen wurde. Einzelne Stämme zeigten nach 15 Stunden einen unklaren orangenen Farbumschlag, sodass eine Einordnung in die oben genannten Gruppen rein optisch schwierig war, diese zeigten jedoch eine nicht erniedrigte Aconitase-Aktivität. Der etwas niedrigere pH-Wert schien in diesem Fall einem insgesamt etwas langsameren Wachstumsmuster dieser Isolate geschuldet zu sein. Stämme mit einer nicht eindeutig gelben Färbung, wurden in der Folge von uns dem ACS Phänotyp zugeordnet. Diese Probleme sind allerdings nicht in der Anwendung von Phenolrot an sich begründet, sondern würden auch auftreten, wenn man den tatsächlichen Acetatgehalt messen würde. Letztlich eignet sich der Phenolrotfarbstoffe aufgrund seiner unkomplizierten Anwendung und des günstigen Preises also auch für das Screening klinischer Staphylokokken Stämme, solange ein festgelegter Messzeitpunkt nach 12-15

Stunden eingehalten wird, es sollten allerdings zur Bestätigung weitere genauere Untersuchungen durchgeführt werden, um falsch positive Ergebnisse zu eliminieren. Die entspräche insgesamt dem im klinischen Alltag etablierten Systemen von Suchtests mit einer hohen Sensitivität und niedrigen Spezifität, bei denen, im Falle eines positiven Ergebnisses ein Bestätigungstest durchgeführt würde.

5.3 Wachstum und Metabolismus

Wir konnten die Ergebnisse von Somerville *et. al* [87], in denen gezeigt wurde, dass bei Laborstämmen von *S. aureus* ein geringeres Wachstum vorliegt als bei dem jeweiligen Wildtyp auch an klinischen Stämmen und anderen Staphylokokkenarten, insbesondere bei *Staphylokokkus epidermidis* bestätigen. Bei uns zeigte sich allerdings ein signifikanter Unterschied im Wachstum erst nach 6 Stunden, dem Zeitpunkt zu dem bei unseren Stämmen der Glukosestoffwechsel beendet war. Wobei wir somit auch zeigen werden konnten, dass die niedrige TCA Zyklus Aktivität nicht sekundär aufgrund eines generell erniedrigten Wachstums zustande kommt, da hier schon vor Ablauf der 6 Stunden ein Wachstumsunterschied bestanden hätte. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Nelson und Kollegen zumindest in dem Vergleich von VISA und VRSA Stämme auch vor 6 Stunden ein Unterschied im Wachstum. Da hier aber auch schon früher Acetat im Medium nachweisbar war, begann die stationäre Wachstumsphase hier am ehesten früher als bei unseren Stämmen [58]. In einer Veröffentlichung von 2002 hatten Somerville und Kollegen bereits einen *S. aureus* Stamm und die dazugehörige Mutante mit einem mit einem Aconitase knock out untersucht. Hier konnte bis zu 6 Stunden sogar ein identisches Wachstum beobachtet werden und dann erst ein schwächeres Wachstum in der Mutante [85]. Auch bei uns zeigte sich ab diesem Zeitpunkt, der den Beginn der stationären Wachstumsphase kennzeichnet eine signifikant höhere Bakteriendichte bei dem ACSs, die bis zum Ende der Messungen (12 Stunden) erhalten blieb. Erwartungsgemäß fand sich

auch zu den separat durchgeführten Messungen zum Zeitpunkt 30 Stunden eine höhere Bakteriendichte bei diesem Phänotyp. Alle diese Beobachtungen bestätigten also ein niedrigeres postexponentielles Wachstum bei klinischen IACS Stämmen. Somerville und Kollegen konnten allerdings bei den oben genannten Laborstämmen durch eine CFU Determination über 200 Stunden zeigen, dass mit einem TCA Zyklus ab etwa 70 Stunden eine konstante Abnahme an vitalen Zellen zu verzeichnen war, während die Anzahl in der Mutante konstant blieb [85]. Betrachtete man auch in unserer Arbeit die Menge der tatsächlich vitalen und teilungsfähigen Bakterien, so fanden sich ebenfalls klare Unterschiede in den beiden Gruppen im Verlauf. Nach 10 Stunden Wachstum, in der stationären Phase, war die Anzahl an Kolonie-bildenden Zellen in der ACS Gruppe noch höher. Nach 30 Stunden, in der spätstationären Phase, zeigte sich allerdings in der IACS Gruppe kein signifikanter Unterschied im Anteil an teilungsfähigen Zellen zu den vorherigen Zeitpunkten, wobei bei den ACSs eine klare Abnahme der CFU im Vergleich zu den vorhergehenden Messzeitpunkten zu erkennen war. Eine Aussage zu der tatsächlich vorhandenen Anzahl lebender Bakterien kann in dieser späten Wachstumsphase zumindest für die vorliegenden klinischen Stämme mittels der Messung der optischen Dichte nicht getroffen werden, da auch abgestorbene Zellen zu einer Änderung der Dichte führen. Dies zeigt sich besonders deutlich, wenn man das tatsächliche Verhältnis lebender zu toter Bakterien betrachtet. Trotz einer großen Heterogenität war der Anteil lebender Zellen in den Stämmen, die dem ACS Typ zugehörten, deutlich niedriger als bei denen vom IACS Typ. Bei der ACS-Gruppe kam es im weiteren Wachstumsverlauf weiter zu einer kontinuierlichen Abnahme des Anteils lebender Zellen. Da in unserer Arbeit zur Beurteilung des Langzeitüberlebens ein „Life-Death Stain“ verwendet wurde, lassen sich die Ergebnisse nur bedingt mit denen von Somerville und Kollegen vergleichen, da hier lediglich die CFU bestimmt wurde [85]. Letztlich konnten wir zeigen, dass bereits ein eingeschränkter Tricarbonsäurezyklus bei klinischen Stämmen schon zu einem erhöhten Langzeitüberleben führt. Außerdem konnten feststellen, dass sich auch in *S. epidermidis* ein eingeschränkter TCA-Zyklus positiv auf die bakterielle Persistenz ausübte. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass in Zellen mit verminderter TCA-

Zyklusaktivität weniger potenziell zellschädigende Stoffe, wie z.B. Sauerstoffradikale entstanden, als es in Bakterien mit einem normal ablaufenden Zitratzyklus der Fall gewesen wäre [101].

5.4 Mögliche Grundlagen der verminderten Aconitase-Aktivität

Untersuchungen zu der Bedeutung des TCA-Zyklus fanden sich bislang vorrangig bei Laborstämmen [58, 85, 87]. Hierbei wurden insbesondere Bakterien mit einem Knock out für das Schlüsselenzym des Zitratzyklus, der Aconitase untersucht. Auch bei einer Inaktivierung des Hitzeschockproteins ClpC kommt es zu einer starken Verringerung des TCA-Zyklus, weshalb wir uns dazu entschlossen haben, auch die Expression dieses Proteins in ausgewählten Isolaten zu quantifizieren. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Stamm mit völlig aufgehobener TCA-Zyklus-Aktivität identifiziert werden. Vielmehr fanden sich erniedrigte, jedoch verschieden starke Aktivitäten in der IACS Gruppe. Auch in der ACS-Gruppe zeigte sich eine hohe Varianz in der Aconitase-Aktivität. Der Grund dafür findet sich in den verschiedenen genetischen Hintergründen bei klinischen Stämmen. So zeigten sich in der exponentiellen Wachstumsphase schon Unterschiede im Wachstumsverhalten innerhalb der jeweiligen Gruppen, die nicht in Zusammenhang mit der TCA-Zyklus Aktivität stehen können. Bei den zuvor untersuchten Laborstämmen mit der jeweiligen knock out Mutante, war das Wachstum bis zu diesem Zeitpunkt dagegen identisch [85]. Bei den hier untersuchten Isolaten war allerdings kein signifikanter Unterschied in der Transkription, des für die Aconitase kodierende *citB* zu erkennen, nur zu Beginn der stationären Wachstumsphase zeigten sich in der ACS Gruppe höhere Transkriptmengen dieses Gens. Wenn man *S. aureus* und *S. epidermidis* betrachtet, gab es interessanterweise Unterschiede im Expressionsverhalten von *clpC*. In *S. epidermidis* lag zu allen Messzeitpunkten eine höhere *clpC*-Transkription in der IACS-Gruppe vor. Auch dort war allerdings bei beiden Phänotypen eine große Streubreite der Werte zu beobachten. Die höhere

Expression von *clpC* in *S. epidermidis*, unterstützte zusammen damit, dass es keinen Signifikanten Unterschied in der *citB* Transkription gab, wiederum die These, dass die erniedrigte TCA-Zyklus Aktivität auf Defekte in den entsprechenden Enzymen zurückzuführen ist. Um die Enzyme vermehrt abbauen zu können, ist im Allgemeinen eine erhöhte Produktion von Hitzeschockproteinen, wie zum Beispiel ClpC, von Nöten. Zudem fand sich auch ein Anstieg der *clpC* Expression im Zeitverlauf. Auch dies ließ auf eine steigende Akkumulation von defekten Enzymen schließen, die abgebaut werden mussten. Bei *S. aureus* hingegen konnte zum frühen Messzeitpunkt (6 h) eine signifikant höhere *clpC* Expression in der ACS Gruppe beobachtet werden, während zu den späteren Messzeitpunkten (10 und 12 h) dagegen keine klaren Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen waren. Zumindest der starke Anstieg der *clpC* Expression im Wachstumsverlauf in der IACS Gruppe passte jedoch zu der Hypothese des höheren Bedarfs an Hitzeschockproteinen während den späteren Zeitpunkten. Allgemein bestand bei der *S. aureus* Gruppe allerdings das Problem der kleinen Probenzahl (n=4), die der niedrigen Prävalenz des IACS Phänotyps in dieser Spezies geschuldet ist. Die allgemein hohe Expression von *acsA* ließ zusätzlich darauf schließen, dass der erniedrigte Acetatkatabolismus nicht das Resultat eines verminderten Acetattransports in die Zelle ist. Letztlich bleibt die Frage, wie es nun zu der erniedrigten Aconitase Aktivität kommt. Hier sind insbesondere zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen kann es zu Punktmutationen innerhalb des entsprechenden Gens gekommen sein, wodurch auch die erhöhte ClpC Aktivität zu erklären wäre, andererseits kann es sich hierbei auch um spezielle Eigenschaften der jeweiligen Sequenztypen handeln. Welcher dieser Fälle nun zutreffend ist, könnte in Zukunft durch Typisierung/Sequenzierung der vorliegenden Stämme gesichert werden. Natürlich ist es auch möglich, dass es generell verschiedene Ursachen für den verminderten Acetatkatabolismus gibt. Dies würde insbesondere die große Streubreite der Ergebnisse in der Analyse der Genexpression erklären. Auch Chittezhham und Kollegen haben im Jahr 2013 ein Screening auf einen eingeschränkten Acetatkatabolismus in *S. epidermidis* durchgeführt. Dort wurde nach 24 Stunden der Acetatgehalt im Medium von 126 klinischen Stämmen bestimmt, wobei 14% als Stämme mit einem stark

eingeschränkten Tricarbonsäurezyklus gesehen wurden. In unserem Screening konnten wir dagegen 22% der Stämme als IACS einordnen. Dies kann zum einen in den unterschiedlichen Messmodalitäten liegen. Wie oben beschrieben würden wir einen Messzeitpunkt von 12-15 Stunden bevorzugen. Außerdem wurde im Gegensatz zu unserer Arbeit bei Chittezhham und Kollegen nur die Acetatmenge nicht aber die tatsächliche Aktivität des TCA –Zyklus bestimmt. Eine andere Ursache für die verschiedenen Werte kann allerdings auch in den verschiedenen klinischen Hintergründen liegen, da das Screening von Thomas et al. in den USA durchgeführt wurde [11].

5.5 Überlebensvorteile und Antibiotika Resistenz

Insgesamt war der Anteil des IACS-Phänotyps innerhalb der Koagulase-negativen Staphylokokken überraschend hoch, wenn man die die Ergebnisse von Nelson und Kollegen zugrunde legt, wo ja nur ein geringer Anteil der VSSA einen solchen Phänotyp aufwies [58]. Prinzipiell würde man erwarten, dass Stämme vom ACS-Phänotyp aufgrund des schnelleren Wachstums deutlich im Vorteil wären. Auch die Produktion der sekretorischen Virulenz Faktoren ist in hohem Maße eng an einen funktionierenden TCA Zyklus gekoppelt und hat ihr Produktionsmaximum dementsprechend in der stationären Wachstumsphase, wenn eine hohe Zitratzyklusaktivität vorhanden ist. Allerdings besitzt z.B. *S. epidermidis* ein viel geringeres Arsenal an Virulenz Faktoren als *S. aureus* [64]. Gleichzeitig ist bei *S. aureus* der Anteil von IACS viel geringer. Möglicherweise ist das also darin begründet, dass in *S. aureus* Stämmen die verminderte Produktion von sekretorischen Virulenz Faktoren ein Grund für den fehlenden „Erfolg“ von IACSS Stämmen darstellt, diese also nicht konkurrenzfähig genug sind. Im Gegensatz dazu ist *S. epidermidis* ein überwiegend komensales Bakterium. Hier scheint eine, im Zuge einer verringerten TCA-Zyklus-Aktivität konsekutiv verminderte Virulenz Faktor Produktion nicht nachteilig zu sein bzw. könnten eventuelle Vorteile, die ein verminderter Zitratzyklus mit sich bringt und das damit verbundene langsame

Wachstum überwiegen. Der Zusammenhang zwischen einem fehlenden Acetat-katabolismus und einem verbessertem Wachstum in Anwesenheit von β -Laktam Antibiotika konnte kürzlich von Chittezhham und Kollegen gezeigt werden. Wobei dieser Vorteil bei anderen untersuchten Antibiotika nicht zu sehen war. Als mögliche Ursache wurde dabei eine erhöhte Toleranz gegenüber oxidativem Stress, verminderte Bildung von freien Radikalen und eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Autolysinen gesehen [11]. Dieser beschriebene Wachstumsvorteil in Anwesenheit von β -Laktam Antibiotika kann eine Erklärung für den in unserem Screening hohen Anteil an IACS bei den Koagulase negativen Staphylokokken darstellen. Auch Chittezhham und Kollegen waren der Meinung, dass klinische Stämme mit einem verminderten Acetat-katabolismus bei dem umfangreichen Einsatz von β -Laktam Antibiotika im klinischen Alltag einen Wachstumsvorteil besäßen. Allerdings wurden ihrer Arbeit Kollegen die Versuche vor allem bei Antibiotikakonzentrationen unterhalb der MIK bei Laborstämmen durchgeführt [11]. Wir konzentrierten uns in der vorliegenden Arbeit allerdings auf die Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin, konnten aber bei den untersuchten Bakterienstämmen sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei *S. aureus* keine erhöhte Vancomycin-Resistenz bei der IACS Gruppe feststellen. Die verminderte Zitratzyklusaktivität kann somit nicht die alleinige Ursache für eine erhöhte Vancomycin-Toleranz sein. Auch Nelson und Kollegen fanden ja bereits in der VSSA Gruppe Stämme mit einem eingeschränkten Acetat-katabolismus [58]. Interessanterweise zeigte sich in unserer Arbeit weitaus geringerer Anteil an IACS-Stämmen bei den MSSA als bei den MRSA. Dies ist im gewissen Maße kohärent zu den zuvor erwähnten Ergebnisse von Chittezhham und Kollegen [11]. Es scheint also so, dass der Anteil des IACS-Phänotyps an der Grundgesamtheit scheint also mit dem Ausmaß an Resistenzen gegenüber Betalaktam-Antibiotika zuzunehmen. Hiermit würde sich auch der hohe Anteil von Stämmen mit dem entsprechenden Metabolismusverhalten bei *S. epidermidis* erklären. Bei einem großen Anteil der klinischen *S. epidermidis*-Stämme fanden sich nämlich multiple Resistenzen, insbesondere wie in unserem Screening festgestellt werden konnte, auch gegen das zuvor erwähnte Methicillin. Interessant wäre daher in der Zukunft klinische *S. epidermidis* Stämme hinsichtlich ihres Antibiotikaprofils und eines

eingeschränkten Acetatkatabolismus zu untersuchen

5.6 Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche können nur Aussagen über das Bakterienverhalten *in vitro* und unter den oben genannten festen Bedingungen beim Wachstum in einem Kulturmedium treffen. Im Wirtsorganismus können dagegen ganz unterschiedliche Gegebenheiten vorherrschen. Innerhalb von abgekapselten Abszessen finden sich Wachstumsbedingungen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass eine bestimmte, endliche Menge an Nährstoffen vorhanden ist, sodass es im Verlauf zu einer Verminderung dieser Nährstoffe und einer Ansammlung bestimmter Metaboliten kommt. Im Gegensatz dazu entspricht der Blutkreislauf einem Fließsystem mit einem stetigen An- und Abtransport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten. In solch einer Umgebung, wo schnell verstoffwechselbare Kohlenstoffquellen wie Glukose vorhanden sind, kommt es physiologischer Weise schon zu einer Suppression des Zitratzyklus durch Kohlenstoffmetabolit-beeinflusste Regulatoren wie dem Kohlenstoffkatabolit Protein A (CcpA), so dass es in diesem Milieu wahrscheinlich keinen Unterschied im Metabolismus zwischen den beiden untersuchten Gruppen gibt. Ein wichtiger Faktor - wenn es um die Persistenz eines Krankheitserregers geht – ist im menschlichen Körper nun auch seine Fähigkeit, in Wirtszellen zu internalisieren und in diesen intrazellulär zu überleben. Sowohl für *S. aureus* als auch für *S. epidermidis* konnte ein solcher Internalisierungs- und Persistenzmechanismus gezeigt werden. Inwieweit diese ---Mechanismen in klinischen Stämmen durch eine Verminderung der TCA-Zyklusaktivität verändert werden, muss zukünftig noch geklärt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter *in vitro* Bedingungen Staphylokokken Stämme mit einem IACS-Phänotyp ein höheres Langzeitüberleben im Vergleich zu Bakterien ohne Einschränkung im Acetatkatabolismus zeigen. Letztlich stellt sich allerdings die Frage, ob und inwieweit ein Phänotyp, der durch einen verminderten Acetatkatabolismus

gekennzeichnet ist, auch *in vivo* einen Überlebensvorteil besitzt. Hierzu gibt es bislang nur wenige Daten. So konnte allerdings in der Zellkultur gezeigt werden, dass ein verminderter TCA-Zyklus in *S. aureus* scheinbar Auswirkungen auf die Produktion von NO von Phagozyten hat, was zu einem verlängerten Überleben der Bakterien führt [51]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine verminderte TCA-Zyklusaktivität unter bestimmten Wachstumsbedingungen, insbesondere in Hinblick auf den Kampf gegen das Wirtsimmunsystem, von Nachteil sein kann. Die niedrige Prävalenz des IACS Phänotyps in *S. aureus*, der im Gegensatz zu den Koagulase-negativen Staphylokokken sein pathogenes Potenzial vermehrt der Produktion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren verdankt, deren Expression in Zusammenhang mit dem TCA Zyklus steht [86], liefert einen Hinweis darauf. Die ist durch den, in einem offenen Fließsystem, wie dem Wirtskörper, vorhanden Selektionsdruck, zu begründen.

5.7 Zusammenfassung

Es gibt zwar bislang schon diverse Untersuchungen, die sich mit dem Auswirkungen des Zitratzyklus, auf das Überleben der Bakterien [85], Änderungen im Wachstumsverhalten [87], der Produktion von Virulenzfaktoren [86] und mögliche Antibiotikaresistenzen [11, 58] beschäftigten. Doch alle diese Untersuchungen wurden bislang nur an Laborstämmen durchgeführt, bei denen ein kompletter „Knock-out“ der Aconitase vorlag. Chittezhham und Kollegen haben zwar auch ein kleiner angelegtes Screening für einen eingeschränkten Acetatkatabolismus in *S. epidermidis* durchgeführt [11]. Weitergehende Untersuchungen vor allem hinsichtlich des Langzeitüberlebens in solchen Stämmen wurden bisher noch nicht veröffentlicht. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich auch im klinischen Umfeld Staphylokokken-Isolate mit einem verminderten Acetatkatabolismus finden. Allerdings zeigten die meisten, der hier untersuchten Stämme eine stark unterschiedliche Ausprägung im Acetatkatabolismus, was möglicherweise durch eine große genetische

Heterogenität - insbesondere bei den Koagulase-negativen Stämmen - bedingt war. Dennoch ließen sich mit Hilfe des Phenolrotscreenings zuverlässig Stämme mit einer eingeschränkten Aktivität identifizieren. Im Gegensatz zu den bisherigen Arbeiten, bei denen Laborstämme betrachtet wurden, zeigten sich bei den diesbezüglich untersuchten klinischen IACS Isolaten nur eine schwach verminderte Expression der Aconitase, so dass die Ursache für den eingeschränkten Acetatmetabolismus hier (vermutlich) nicht in einer verminderten Genexpression der TCA Zyklus-Komponenten zu suchen ist. Auch, wenn die genaue Ursache für die verminderte TCA Zyklus-Aktivität der IACS in dieser Arbeit nicht eruiert werden konnte, legen die Transkriptionsdaten nahe, dass das Enzym in ausreichender Menge exprimiert wurde, die Aktivität pro Mol allerdings eingeschränkt ist. Dies kann z.B. aufgrund von Punktmutationen geschehen sein, die in der Synthese eines leicht fehlerhaften Enzyms enden. Alternativ können durch eine veränderte Translation Unterschiede in der Stabilität des Enzyms entstehen, die dazu führen, dass die IACSs eine verminderte Aconitase-Aktivität aufwiesen. Die enge Korrelation der Aconitase-Aktivitäten mit den Acetatsmengen in den Überständen der Staphylokokken-Kulturen lässt jedoch darauf schließen, dass Unterschiede in der Wiederaufnahmefähigkeit von Acetat sehr wahrscheinlich nicht für die verminderte Tricarbonsäurezyklus-Aktivität in den IACS ursächlich ist. Die verminderte TCA-Aktivität in IACS hingegen könnte mit einem deutlich höheren Langzeitüberleben der Vertreter dieses Phänotyps korreliert werden. Es bleibt jedoch bislang unklar inwieweit der IACS Phänotyp eine tatsächlich klinische Bedeutung hat. Weitere Untersuchungen bezüglich einer veränderten Persistenz der Staphylokokken mit einer verminderten TCA-Zyklus Aktivität, insbesondere in Hinblick auf ein verlängertes intrazelluläres Überleben des Pathogens, sind ebenfalls notwendig, da Isolate mit IACS Phänotyp aufgrund ihrer verbesserten Langzeitüberlebensfähigkeit mit einer erhöhten Reinfektionsrate korreliert sein können und eventuell eine verbesserte *in vivo* Antibiotikaresistenz aufweisen. Des Weiteren wären langfristig auch klinische Studien sinnvoll, bei denen der tatsächliche Krankheitsverlauf von Infektionen beobachtet werden kann, von denen bekannt ist, dass das Pathogen einen verminderten Acetatkatabolismus aufweist. Das Phenolrotscreening würde hierbei

- bei einer gesicherten Staphylokokken Infektion - ein gutes diagnostisches Werkzeug darstellen. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da die bisherigen Daten auf eine nicht geringe klinische Bedeutung von einem eingeschränkten Tricarbonsäurezyklus, insbesondere im Hinblick auf persistierende Infektionen und mangelndem Ansprechen auf eine antibiotische Therapie.

-

6 Literaturverzeichnis

1. Appelbaum, P.C. (2007) Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 30: 398-408
2. Balwit, J.M., P. van Langevelde, J.M. Vann, R.A. Proctor (1994) Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis* 170: 1033-7
3. Barber, M. (1961) Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol* 14: 385-93
4. Begun, J., J.M. Gaiani, H. Rohde, D. Mack, S.B. Calderwood, F.M. Ausubel, C.D. Sifri (2007) Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* 3: e57
5. Boisset, S., T. Geissmann, E. Huntzinger, P. Fechter, N. Bendridi, M. Possedko, C. Chevalier, A.C. Helfer, Y. Benito, A. Jacquier, C. Gaspin, F. Vandenesch, P. Romby (2007) *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* 21: 1353-66
6. Chatterjee, I., P. Becker, M. Grundmeier, M. Bischoff, G.A. Somerville, G. Peters, B. Sinha, N. Harraghy, R.A. Proctor, M. Herrmann (2005) *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery, and death. *J Bacteriol* 187: 4488-96
7. Chatterjee, I., M. Herrmann, R.A. Proctor, G. Peters, B.C. Kahl (2007) Enhanced post-stationary-phase survival of a clinical thymidine-dependent small-colony variant of *Staphylococcus aureus* results from lack of a functional tricarboxylic acid cycle. *J Bacteriol* 189: 2936-40
8. Chatterjee, I., S. Schmitt, C.F. Batzilla, S. Engelmann, A. Keller, M.W. Ring, R. Kautenburger, W. Ziebuhr, M. Hecker, K.T. Preissner, M. Bischoff, R.A. Proctor, H.P. Beck, H.P. Lenhof, G.A. Somerville, M. Herrmann (2009) *Staphylococcus aureus* ClpC ATPase is a late growth phase effector of metabolism and persistence. *Proteomics* 9: 1152-76
9. Cheung, A.L., A.S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham, Y.Q. Xiong (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40: 1-9
10. Cheung, G.Y., K. Rigby, R. Wang, S.Y. Queck, K.R. Braughton, A.R. Whitney, M. Teintze, F.R. DeLeo, M. Otto (2010) *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils. *PLoS Pathog*

6: e1001133

11. Chittezhham Thomas, V., L.C. Kinkead, A. Janssen, C.R. Schaeffer, K.M. Woods, J.K. Lindgren, J.M. Peaster, S.S. Chaudhari, M. Sadykov, J. Jones, S.M. AbdelGhani, M.C. Zimmerman, K.W. Bayles, G.A. Somerville, P.D. Fey (2013) A dysfunctional tricarboxylic acid cycle enhances fitness of *Staphylococcus epidermidis* during beta-lactam stress. *MBio* 4:
12. Collins, F.M.,J. Lascelles (1962) The effect of growth conditions on oxidative and dehydrogenase activity in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 29: 531-5
13. Cosgrove, S.E., G. Sakoulas, E.N. Perencevich, M.J. Schwaber, A.W. Karchmer, Y. Carmeli (2003) Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 36: 53-9
14. Costerton, J.W., P.S. Stewart, E.P. Greenberg (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-22
15. Cramton, S.E., M. Ulrich, F. Gotz, G. Doring (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 69: 4079-85
16. Cui, L., X. Ma, K. Sato, K. Okuma, F.C. Tenover, E.M. Mamizuka, C.G. Gemmell, M.N. Kim, M.C. Ploy, N. El-Solh, V. Ferraz, K. Hiramatsu (2003) Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41: 5-14
17. Dobinsky, S., K. Kiel, H. Rohde, K. Bartscht, J.K. Knobloch, M.A. Horstkotte, D. Mack (2003) Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* 185: 2879-86
18. Dunman, P.M., E. Murphy, S. Haney, D. Palacios, G. Tucker-Kellogg, S. Wu, E.L. Brown, R.J. Zagursky, D. Shlaes, S.J. Projan (2001) Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol* 183: 7341-53
19. Faurschou, M.,N. Borregaard (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5: 1317-27
20. Fridkin, S.K. (2001) Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. *Clin Infect Dis* 32: 108-15
21. Galdbart, J.O., J. Allignet, H.S. Tung, C. Ryden, N. El Solh (2000)

- Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* 182: 351-5
22. Gardner, J.F., J. Lascelles (1962) The requirement for acetate of a streptomycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 29: 157-64
 23. Gill, S.R., D.E. Fouts, G.L. Archer, E.F. Mongodin, R.T. Deboy, J. Ravel, I.T. Paulsen, J.F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R.J. Dodson, S.C. Daugherty, R. Madupu, S.V. Angiuoli, A.S. Durkin, D.H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I.R. Hance, K.E. Nelson, C.M. Fraser (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187: 2426-38
 24. Goff, S.A., A.L. Goldberg (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* 41: 587-95
 25. Goldschmidt, M.C., D.M. Powelson (1953) Effect of the culture medium on the oxidation of acetate by *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. *Arch Biochem Biophys* 46: 154-63
 26. Gottesman, S. (1999) Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr Opin Microbiol* 2: 142-7
 27. Gotz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43: 1367-78
 28. Guest, J.R. (1992) Oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. The 1992 Marjory Stephenson Prize Lecture. *J Gen Microbiol* 138: 2253-63
 29. Hahn, H., et al (2001) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer 4:
 30. Hanaki, H., K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R.S. Daum, H. Labischinski, K. Hiramatsu (1998) Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* 42: 199-209
 31. Harder, J., J.M. Schroder (2005) Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* 86: 22-41
 32. Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, F. Gotz (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 20: 1083-91
 33. Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F.C. Tenover (1997)

- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40: 135-6
34. Hiramatsu, K., Y. Katayama, H. Yuzawa, T. Ito (2002) Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 292: 67-74
 35. Huntzinger, E., S. Boisset, C. Saveanu, Y. Benito, T. Geissmann, A. Namane, G. Lina, J. Etienne, B. Ehresmann, C. Ehresmann, A. Jacquier, F. Vandenesch, P. Romby (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J* 24: 824-35
 36. Jarvis, W.R., J. Schlosser, R.Y. Chinn, S. Tweeten, M. Jackson (2007) National prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients at US health care facilities, 2006. *Am J Infect Control* 35: 631-7
 37. Jones, R.N., M. Flonta, N. Gurler, M. Cepparulo, R.E. Mendes, M. Castanheira (2013) Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis*
 38. Kahl, B.C., A. Duebbers, G. Lubritz, J. Haeberle, H.G. Koch, B. Ritzerfeld, M. Reilly, E. Harms, R.A. Proctor, M. Herrmann, G. Peters (2003) Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol* 41: 4424-7
 39. Kessel, M., M.R. Maurizi, B. Kim, E. Kocsis, B.L. Trus, S.K. Singh, A.C. Steven (1995) Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J Mol Biol* 250: 587-94
 40. Kloos, W.E., M.S. Musselwhite (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol* 30: 381-5
 41. Kobayashi, S.D., J.M. Musser, F.R. DeLeo (2012) Genomic analysis of the emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* 3:
 42. Kozitskaya, S., S.H. Cho, K. Dietrich, R. Marre, K. Naber, W. Ziebuhr (2004) The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 72: 1210-5
 43. Krebs, H.A. (1937) Dismutation of pyruvic acid in *Gonococcus* and *Staphylococcus*. *Biochem J* 31: 661-71
 44. Lai, Y., A.E. Villaruz, M. Li, D.J. Cha, D.E. Sturdevant, M. Otto (2007) The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol Microbiol* 63: 497-506

45. Li, M., X. Wang, Q. Gao, Y. Lu (2009) Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol* 58: 456-61
46. Lim, S.M., S.A. Webb (2005) Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. *Anaesthesia* 60: 887-902
47. Mack, D. (1999) Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* 43 Suppl: S113-25
48. Mack, D., P. Becker, I. Chatterjee, S. Dobinsky, J.K. Knobloch, G. Peters, H. Rohde, M. Herrmann (2004) Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol* 294: 203-12
49. Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, R. Laufs (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 178: 175-83
50. Massey, R.C., M.J. Horsburgh, G. Lina, M. Hook, M. Recker (2006) The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? *Nat Rev Microbiol* 4: 953-8
51. Massilamany, C., A. Gangaplara, D.J. Gardner, J.M. Musser, D. Steffen, G.A. Somerville, J. Reddy (2011) TCA cycle inactivation in *Staphylococcus aureus* alters nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Mol Cell Biochem* 355: 75-82
52. McAleese, F., S.W. Wu, K. Sieradzki, P. Dunman, E. Murphy, S. Projan, A. Tomasz (2006) Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate- *S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J Bacteriol* 188: 1120-33
53. Miragaia, M., J.C. Thomas, I. Couto, M.C. Enright, H. de Lencastre (2007) Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 189: 2540-52
54. Mongodin, E., J. Finan, M.W. Climo, A. Rosato, S. Gill, G.L. Archer (2003) Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* 185: 4638-43
55. Morfeldt, E., K. Tegmark, S. Arvidson (1996) Transcriptional control of the agr-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 21: 1227-37
56. Nannini, E., B.E. Murray, C.A. Arias (2010) Resistance or decreased

- susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Pharmacol* 10: 516-21
57. National Nosocomial Infections Surveillance, S. (2004) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 32: 470-85
 58. Nelson, J.L., K.C. Rice, S.R. Slater, P.M. Fox, G.L. Archer, K.W. Bayles, P.D. Fey, B.N. Kreiswirth, G.A. Somerville (2007) Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains have impaired acetate catabolism: implications for polysaccharide intercellular adhesin synthesis and autolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 616-22
 59. Noble, W.C., H.A. Valkenburg, C.H. Wolters (1967) Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J Hyg (Lond)* 65: 567-73
 60. Novick, R.P., S.J. Projan, J. Kornblum, H.F. Ross, G. Ji, B. Kreiswirth, F. Vandenesch, S. Moghazeh (1995) The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 248: 446-58
 61. Novick, R.P., H.F. Ross, S.J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, S. Moghazeh (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 12: 3967-75
 62. O'Gara, J.P. (2007) *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 270: 179-88
 63. O'Grady, N.P., M. Alexander, E.P. Dellinger, J.L. Gerberding, S.O. Heard, D.G. Maki, H. Masur, R.D. McCormick, L.A. Mermel, M.L. Pearson, Raad, II, A. Randolph, R.A. Weinstein (2002) Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 51: 1-29
 64. Otto, M. (2009) *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7: 555-67
 65. Otto, M. (2012) Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol* 34: 201-14
 66. Otto, M., R. Sussmuth, G. Jung, F. Gotz (1998) Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* *agr* system. *FEBS Lett* 424: 89-94
 67. Perichon, B.,P. Courvalin (2009) VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4580-7

68. Pourmand, M.R., S.R. Clarke, R.F. Schuman, J.J. Mond, S.J. Foster (2006) Identification of antigenic components of *Staphylococcus epidermidis* expressed during human infection. *Infect Immun* 74: 4644-54
69. Proctor, R.A., C. von Eiff, B.C. Kahl, K. Becker, P. McNamara, M. Herrmann, G. Peters (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4: 295-305
70. Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, W. Ziebuhr (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3357-63
71. Recsei, P., B. Kreiswirth, M. O'Reilly, P. Schlievert, A. Gruss, R.P. Novick (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 202: 58-61
72. Rehm, S.J., A. Tice (2010) *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Clin Infect Dis* 51 Suppl 2: S176-82
73. Rello, J., A. Ochagavia, E. Sabanes, M. Roque, D. Mariscal, E. Reynaga, J. Valles (2000) Evaluation of outcome of intravenous catheter-related infections in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1027-30
74. Rice, K.C., T. Patton, S.J. Yang, A. Dumoulin, M. Bischoff, K.W. Bayles (2004) Transcription of the *Staphylococcus aureus* *cid* and *lrg* murein hydrolase regulators is affected by sigma factor B. *J Bacteriol* 186: 3029-37
75. Riley, P.A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65: 27-33
76. Rogers, K.L., P.D. Fey, M.E. Rupp (2009) Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 23: 73-98
77. Rupp, M.E., J.S. Ulphani, P.D. Fey, D. Mack (1999) Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* 67: 2656-9
78. Sadovskaya, I., E. Vinogradov, S. Flahaut, G. Kogan, S. Jabbouri (2005) Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infect Immun* 73: 3007-17
79. Sadykov, M.R., T. Hartmann, T.A. Mattes, M. Hiatt, N.J. Jann, Y. Zhu, N. Ledala, R. Landmann, M. Herrmann, H. Rohde, M. Bischoff, G.A. Somerville (2011) CcpA coordinates central metabolism and biofilm

- formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 157: 3458-68
80. Said-Salim, B., P.M. Dunman, F.M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P.J. McNamara, S. Arvidson, T.J. Foster, S.J. Projan, B.N. Kreiswirth (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* 185: 610-9
 81. Schirmer, E.C., J.R. Glover, M.A. Singer, S. Lindquist (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* 21: 289-96
 82. Seidl, K., M. Stucki, M. Ruegg, C. Goerke, C. Wolz, L. Harris, B. Berger-Bachi, M. Bischoff (2006) *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1183-94
 83. Seifert, H., C. von Eiff, G. Fatkenheuer (1999) Fatal case due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerg Infect Dis* 5: 450-3
 84. Sieradzki, K., A. Tomasz (2003) Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 185: 7103-10
 85. Somerville, G.A., M.S. Chaussee, C.I. Morgan, J.R. Fitzgerald, D.W. Dorward, L.J. Reitzer, J.M. Musser (2002) *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infect Immun* 70: 6373-82
 86. Somerville, G.A., R.A. Proctor (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 233-48
 87. Somerville, G.A., B. Said-Salim, J.M. Wickman, S.J. Raffel, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser (2003) Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: implications for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 71: 4724-32
 88. Stadtman, E.R., B.S. Berlett (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10: 485-94
 89. Strasters, K.C., K.C. Winkler (1963) Carbohydrate Metabolism of *Staphylococcus Aureus*. *J Gen Microbiol* 33: 213-29
 90. Styers, D., D.J. Sheehan, P. Hogan, D.F. Sahm (2006) Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 2

91. Sun, F., C. Li, D. Jeong, C. Sohn, C. He, T. Bae (2010) In the *Staphylococcus aureus* two-component system *sae*, the response regulator SaeR binds to a direct repeat sequence and DNA binding requires phosphorylation by the sensor kinase SaeS. *J Bacteriol* 192: 2111-27
92. Thoendel, M., J.S. Kavanaugh, C.E. Flack, A.R. Horswill (2011) Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* 111: 117-51
93. Tseng, C.W., G.C. Stewart (2005) Rot repression of enterotoxin B expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187: 5301-9
94. Turgay, K., M. Persuh, J. Hahn, D. Dubnau (2001) Roles of the two ClpC ATP binding sites in the regulation of competence and the stress response. *Mol Microbiol* 42: 717-27
95. Uckay, I., D. Pittet, P. Vaudaux, H. Sax, D. Lew, F. Waldvogel (2009) Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann Med* 41: 109-19
96. Ulveling, D., C. Francastel, F. Hube (2011) When one is better than two: RNA with dual functions. *Biochimie* 93: 633-44
97. von Eiff, C., K. Becker, D. Metze, G. Lubritz, J. Hockmann, T. Schwarz, G. Peters (2001) Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. *Clin Infect Dis* 32: 1643-7
98. Vuong, C., J.M. Voyich, E.R. Fischer, K.R. Braughton, A.R. Whitney, F.R. DeLeo, M. Otto (2004) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 6: 269-75
99. Weigel, L.M., D.B. Clewell, S.R. Gill, N.C. Clark, L.K. McDougal, S.E. Flannagan, J.F. Kolonay, J. Shetty, G.E. Killgore, F.C. Tenover (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302: 1569-71
100. Williams, R.E. (1963) Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* 27: 56-71
101. Wright, G.D. (2007) On the road to bacterial cell death. *Cell* 130: 781-3
102. Yao, Y., D.E. Sturdevant, M. Otto (2005) Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* 191: 289-98
103. Yao, Y., D.E. Sturdevant, A. Villaruz, L. Xu, Q. Gao, M. Otto (2005) Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by

comparative genomics. Infect Immun 73: 1856-60

104. Ziebuhr, W. (2001) *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. Contrib Microbiol 8: 102-7
105. Ziebuhr, W., S. Hennig, M. Eckart, H. Kranzler, C. Batzilla, S. Kozitskaya (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. Int J Antimicrob Agents 28 Suppl 1: S14-20
106. Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lossner, F. Gotz, J. Hacker (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Mol Microbiol 32: 345-56

7 Publikationen

1. **Chatterjee, I., D. Neumayer, and M. Herrmann.** Senescence of staphylococci: using functional genomics to unravel the roles of ClpC ATPase during late stationary phase. *Int J Med Microbiol* **300**:130-6.
2. **D. Neumayer, I. Chatterjee, C. von Eiff , M. Bischoff, and M. Herrmann.** Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Posterpräsentation auf der Jahrestagung der DGHM 2009. Acetate catabolism and TCA cycle activity in clinical Staphylococci isolates: an implication towards persistence.

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann für die freundliche Überlassung des Themas und für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien. Besonders möchte ich mich bei Professor Herrmann für die Zeit und Arbeit, die er in die Fertigstellung meiner Dissertation investiert hat, sowie seine fortwährende Motivation bedanken. Ein großes Dankeschön geht natürlich auch an Herrn Dr. Indranil Chatterjee für seine Unterstützung, die er mir auch nach seinem Weggang aus Deutschland zuteil werden ließ. Vielen Dank an Herrn PD Dr. Bischoff, für seine Fachkompetenz und vielen Ideen, die mir sehr bei der Fertigstellung meiner Arbeit geholfen haben. Ganz herzlich möchte ich mich noch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, für ein angenehmes Arbeitsumfeld und ihre fachliche, sowie moralische Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt hier Frau Karin Hilgert, für ihre stete Hilfsbereitschaft, wann immer Probleme auftraten. Dem Team des Sekretariats, vor allem Frau Ebel danke ich für jederzeit freundliche und unkomplizierte Hilfe. Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken für die große Unterstützung in allen Lebenslagen und ihre Geduld, mit der sie mir zur Seite gestanden haben und mir so erst die Fertigstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Daniela Stefanie Neumayer

Gerolsteiner Str. 121

D-50937 Köln

geb. am 24. September 1985 in Saarlouis

Beruflicher Werdegang

Seit 02/2012 Assistenzärztin in der Abteilung für Dermatologie,
Universitätsklinikum Köln

Ausbildung

2005-2011	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
10/2007	Erfolgreicher Abschluss des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
10/2011	Erfolgreicher Abschluss des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
1996-2005	Albert-Schweitzer-Gymnasium Dillingen, Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1992-1996	Grundschule Siersburg

Medizinische Praktika

04/2011-07/2011	Unterassistent in der Dermatologischen Klinik des Universitätsspitals Zürich
12/2010-04/2011	PJ in der Abteilung für Chirurgie des SHG Klinikum Merzig
08/2011-12/2011	PJ in der Abteilung für Innere Medizin des SHG Klinikum Merzig
02/2010	Famulatur in der Dermatologischen Abteilung, Universitätsklinik des Saarlandes
09/2009	Famulatur in der Neurologischen Abteilung, SHG Klinikum Sulzbach
03/2009	Famulatur in der Abteilung für Anästhesiologie, Asklepios Klinikum Barmbek
08/2008	Famulatur in der Praxis für Chirurgie, Dr. med. Bernardy, Dillingen/Saar
07/2006-09/2006	Pflegepraktikum im Bereich der Urologie, Gynäkologie und Inneren Medizin, Krankenhaus vom DRK, Saarlouis
04/2006	Pflegepraktikum in der zentralen Krankenaufnahme, Krankenhaus vom DRK, Saarlouis
08/2005	Praktikum im Labor für medizinische Mikrobiologie Jakobs, Dillingen/Saar

Sonstige Tätigkeiten:

05/2006-10/2011	Studentische Aushilfe, Zentrale Krankenaufnahme, Krankenhaus vom DRK Saarlouis
10/2008-06/2010	Studentische Hilfskraft, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität des Saarlandes